

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PRISCILA SOARES DE SOUZA VICTOR**

**REGULAÇÃO NEUROINFLAMATÓRIA DAS NANOPARTÍCULAS DE  
OURO LIGADAS AO ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER EM  
ANIMAIS EXPOSTOS A UM MODELO DE ESCLEROSE MULTIPLA**

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2019**

**PRISCILA SOARES DE SOUZA VICTOR**

**REGULAÇÃO NEUROINFLAMATÓRIA DAS NANOPARTÍCULAS DE  
OURO LIGADAS AO ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER EM  
ANIMAIS EXPOSTOS A UM MODELO DE ESCLEROSE MULTIPLA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Lock Silveira.  
Coorientadora: Jade de Oliveira

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V644r Victor, Priscila Soares de Souza.

Regulação neuroinflamatória das nanopartículas de ouro ligadas ao etilenodicisteína dietil éster em animais expostos a um modelo de esclerose múltipla / Priscila Soares de Souza Victor. - 2019.

83 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Paulo Cesar Lock Silveira.

Coorientação: Jade de Oliveira.

1. Esclerose múltipla - Tratamento. 2. Nanopartículas de ouro - Uso terapêutico. 3. Etilenodicisteína dietil éster. 4. Encefalomielite autoimune experimental. I. Título.

CDD 23. ed. 616.834

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de **DOUTORADO** apresentada pela candidata **Priscila Soares de Souza Victor**, sob o título “**REGULAÇÃO NEUROINFLAMATÓRIA DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO LIGADAS AO ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER EM ANIMAIS EXPOSTOS À UM MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**” do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 12 de dezembro de 2019.

Prof.ª. Dra. GISLAINE ZILLI RÉUS  
Membro Relator – UNESC

Prof.ª. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES  
Membro Interno – UNESC

Prof.ª. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO  
Membro Externo – UNISUL

Prof.ª. Dra. GISLAINE TEZZA REZIN  
Membro Externo – UNISUL

Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira  
Orientador

  
Coordenador PPGCS

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol  
Coordenador do PPGCS

### **FOLHA INFORMATIVA**

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

**Dedico este trabalho a minha filha que nasceu e cresceu com esta tese.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha fortaleza e meu guia.

A minha filha, que esteve comigo desde o início desta tese. Minha guerreira, que com apenas 3 anos e 10 meses já venceu muitos desafios bravamente. Ela me inspira todos os dias. Amo você, minha pequena grande guerreira.

Aos meus pais, Joel e Luiza Helena, por serem sempre tão presentes.

Ao meu marido, Eduardo, que esteve comigo em todos os momentos, sempre me dando força. Obrigada por tudo!

À minha irmã e meu cunhado, que mesmo à distância estão na torcida. Aos meus avós que perdi durante esta caminhada, Zilá e Jaime (*em memorial*). E aos meus avós que estão sempre orando por nós, Nei e Pedra.

Ao meu professor, Ricardo Aurino de Pinho, pela oportunidade de ingressar no doutorado e por todas as contribuições neste trabalho. Você foi o grande responsável por esta conquista. Obrigada!

Ao meu orientador, Paulo Cesar Lock Silveira, por ter acreditado em mim e ter aceitado a continuação da condução deste trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela parceria e pelos resultados alcançados!

A minha coorientadora Jade de Oliveira pelas contribuições.

Aos meus antigos colegas do Laboratório de Fisiologia do Exercício (Lafibe), que iniciaram essa caminhada comigo, em especial, ao colega Fabio Pacheco Brandt. A todos do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, especialmente, Rubya, Guga, Carol, Laura, Dani, Ligia, Matheus e Duda, muito obrigada pelo auxílio na execução deste trabalho, pelo apoio e dedicação de vocês. Ao Paulo Emilio Feuser e Thiago Antonio Moretti de Andrade pelas contribuições. À todos os colegas do Laboratório de Biomedicina Translacional, em especial a Adriani Damiani. Aos colegas do Laboratório de Bioquímica do Exercício em Saúde da PUCPR. Muito obrigada!

A todos os amigos que vibram comigo a cada conquista.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPGCS, e funcionários da UNESC, em especial aos que trabalham no Bloco S e participam de todas as nossas atividades.

À UNESC, CAPES, CNPQ e FAPESC pelo suporte financeiro.

Muito Obrigada!!!

*"Ninguém ignora tudo.*

*Ninguém sabe tudo.*

*Todos nós sabemos alguma coisa.*

*Todos nós ignoramos alguma coisa.*

*Por isso aprendemos sempre".*

*Paulo Freire*



## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica auto-imune desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) que causa incapacidade neurológica e ainda permanece sem uma terapia eficaz. A EM acomete, principalmente, indivíduos brancos na faixa etária entre 20 e 40 anos e com predomínio sobre o sexo feminino. A perda de mielina interfere na transmissão dos impulsos nervosos produzindo os sintomas típicos da doença tais como, parestesias, dificuldade de coordenação motora e locomoção, neurite óptica, tonturas, vertigem, tremores, dor, disfunções sexuais, distúrbios esfincterianos e fadiga. As células T auto-reativas se infiltram no SNC e produzem uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, o que leva a destruição da bainha de mielina. Sabe-se que as nanopartículas de ouro (GNPs) apresentam propriedades anti-inflamatórias. No entanto, atualmente não existem evidências na literatura que avaliem se as GNP's auxiliam no efeito modificador da EM. Além disso, as GNP's podem se dispersar por outros órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea. Assim, com intuito de auxiliar na entrega de GNP's ao SNC foi utilizado o etilenodicisteína dietil éster (ECD). O ECD é um radiofármaco destinado a cintilografia de perfusão cerebral, ele atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e se liga ao SNC. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos das GNP's ligadas ao ECD no SNC de animais expostos a um modelo experimental de EM. Foram utilizados 86 camundongos C57BL/6 fêmeas. A encefalomielite autoimune (EAE), modelo experimental de EM, foi induzida com glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG<sub>35-55</sub>) em adjuvante completo de Freund (CFA), suplementado com *Mycobacterium tuberculosis* (Mt). Cada animal recebeu *toxina Pertussis* no dia 0 e no dia 2 pós-indução. Primeiramente, foi realizado um estudo piloto para avaliar qual concentração de GNP's apresenta um efeito positivo na EAE, e os animais foram divididos em 5 grupos (n = 10 animais/grupo) da seguinte forma: grupo EAE + ECD; grupo EAE + GNP's (1,0mg/L); grupo EAE + GNP's (0,3 mg/L) + ECD; grupo EAE + GNP's (0,6 mg/L) + ECD e grupo EAE + GNP's (1,0mg/L) + ECD. Os resultados mostraram que o grupo tratado com GNP's (0,6mg/L) + ECD apresentou redução de infiltrado inflamatório, redução de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-17 na medula espinhal e melhora da integridade da bainha de mielina, além de uma melhora nos sinais clínicos. A partir destes resultados, foi realizado outro estudo, e os animais foram divididos da seguinte forma: grupo EAE; grupo EAE + GNP's (0,6mg/L) e grupo EAE + GNP's (0,6mg/L) + ECD. Foram analisados o escore clínico e o peso dos animais, formação de óxido nítrico, dano em DNA, citocinas pró- e anti-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10) e NF- $\kappa$ B na medula espinhal. Os resultados mostraram que as GNP's (0,6mg/L) e GNP's (0,6mg/L) + ECD apresentam melhora nos sinais clínicos da doença; houve uma redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, infiltrado inflamatório; redução de óxido nítrico e redução de dano em DNA; além de um aumento da integridade da bainha de mielina nos animais EAE tratados com GNP's (0,6mg/L) + ECD. Assim, os resultados mostram que o tratamento com GNP's (0,6 mg/L) e GNP's (0,6 mg/L) + ECD, melhorou a integridade da bainha de mielina devido a redução de citocinas pro-inflamatórias.

**Palavras-chave:** esclerose múltipla, encefalomielite autoimune experimental, nanopartículas de ouro, GNP's, etilenodicisteína dietil éster.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating chronic autoimmune inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that causes neurological disability and still remains without effective therapy. MS affects white individuals aged between 20 and 40 years and with a predominance in women. The loss of myelin interferes with the transmission of nerve impulses producing the typical symptoms of the disease such as paresthesias, difficulty in motor coordination and locomotion, optic neuritis, dizziness, vertigo, tremors, pain, sexual dysfunctions, sphincter disorders and fatigue. Self-reactive T cells infiltrate the CNS and release a large amount of proinflammatory cytokines, leading to destruction of the myelin sheath. In this context, it is known that gold nanoparticles (GNPs) have anti-inflammatory properties. However, there is currently no evidence in the literature to evaluate whether GNPs assist in the modifying effect of MS. In addition, GNPs can spread to other organs such liver, spleen, lymph nodes and bone marrow. Thus, in order to assist with the delivery of GNP to the CNS, the diethyl ester diethyl ester (DEE) was used. The DEE is a radiopharmaceutical intended for cerebral perfusion scintigraphy, so it crosses the blood-brain barrier (BBB) and binds to the CNS. In this context, the aim of this study was to evaluate the effects of GNPs linked to DEE in the CNS of animals exposed to an experimental model of MS. Were used 86 C57BL/6 females. The autoimmune encephalomyelitis (EAE), experimental model of MS, was induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG<sub>35-55</sub>) in complete Freund's adjuvant (CFA) supplemented with Mycobacterium tuberculosis (Mt). Animals received *Pertussis toxin* on day 0 and day 2 post-induction. First, a pilot study was carried out to assess which concentration of GNPs has a positive effect on EAE, and the animals were divided into 5 groups (n = 10 animals / group) as follows: EAE + DEE group; EAE + GNPs group (1,0mg / L); EAE + GNPs (0,3 mg/L) + DEE group; EAE + GNPs (0,6 mg/L) + DEE group and EAE + GNPs (1,0 mg/L) + DEE group. The results showed that the group treated with GNPs (0.6mg / L) + ECD showed a reduction in inflammatory infiltrate, a reduction in cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-17 in the spinal cord and an improvement in the integrity of the myelin sheath, in addition to a improvement in clinical signs. From these results, another study was carried out, and the animals were divided as follows: EAE group; EAE + GNPs group (0,6mg/L) and EAE + GNPs group (0,6mg/L) + DEE. The clinical score and weight of the animals, formation of nitric oxide, DNA damage, pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, TGF- $\beta$ , IL- 4 and IL-10) and NF-kB in the spinal cord. The results showed that GNPs (0,6mg/L) and GNPs (0,6mg/L) + ECD show improvement in the clinical signs of the disease; there was a reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines, inflammatory infiltrate; reduction of nitric oxide and reduction of DNA damage; in addition to an increase in the integrity of the myelin sheath in EAE animals treated with GNPs (0,6mg/L) + ECD. Thus, the results show that treatment with GNPs (0,6mg/L) and GNPs (0,6 mg/L) + ECD, improved the integrity of the myelin sheath due to the reduction of proinflammatory cytokines.

**Keywords:** multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, gold nanoparticles, GNPs, diethyl ester ethylene dicysteine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Distribuição da Esclerose Múltipla (EM) mundialmente. Imagem adaptada de: GBD 2016 Neurology Collaborators (2019).....	14
<b>Figura 2.</b> Diferentes cursos clínicos da Esclerose Múltipla (EM) conforme o Comitê Consultivo da Sociedade Nacional de EM. Imagem adaptada de: Lublin e Reingold, 1996.....	16
<b>Figura 3.</b> Modificação da classificação dos cursos clínicos da Esclerose Múltipla (EM). Imagem adaptada de: Lublin et al., 2014.....	16
<b>Figura 4.</b> Figura ilustrativa da diferenciação das células TCD4 <sup>+</sup> . Imagem adaptada de: Sethi et al., 2013.....	19
<b>Figura 5.</b> Figura ilustrativa dos possíveis mecanismos de ação das nanopartículas de ouro (GNPs).....	25
<b>Figura 6.</b> Desenho experimental. Imagem obtida pelo autor.....	32
<b>Figura 7.</b> Classes de Danos em DNA.....	36
<b>Figura 8.</b> Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de ouro (GNPs) (A-B) e das GNPs + ECD (etilenodicisteína dietil éster) (C-D).....	38
<b>Figura 9.</b> Análises de espectrofotometria por UV-vís das nanopartículas de ouro (GNPs) e das GNPs + ECD (etilenodicisteína dietil éster).....	39
<b>Figura 10.</b> Análises por espectroscopia por infravermelho (FTIR) das nanopartículas de ouro (GNPs) e das GNPs + ECD (etilenodicisteína dietil éster).....	40
<b>Figura 11.</b> Efeito do tratamento das nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	42
<b>Figura 12.</b> Imagens representativas de cortes histológicos transversais de medula espinhal corados com coloração de (H&E) de animais submetidos a um protocolo experimental de esclerose múltipla e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) + GNPs em três doses (0,3, 0,6 e 1,0).....	43
<b>Figura 13.</b> Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) na produção de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal após a indução da encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	44
<b>Figura 14.</b> Porcentagem de imunoexpressão de IL-17 na medula espinhal de animais expostos à encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com	

nanopartículas de ouro (GNPs) em diferentes concentrações, utilizando o veículo etilenodicisteína dietil éster (ECD).....	45
<b>Figura 15.</b> Imagens representativas da análise imuno-histoquímica da medula espinhal de animais expostos à encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs) em diferentes concentrações, utilizando o veículo etilenodicisteína dietil éster (ECD).....	45
<b>Figura 16.</b> Danos à bainha de mielina após o tratamento com nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) em animais induzidos a EAE.....	46
<b>Figura 17.</b> Efeito do tratamento das nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE).....	48
<b>Figura 18.</b> Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) na produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC após a indução da EAE.....	49
<b>Figura 19.</b> Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) na produção de citocinas anti-inflamatórias no SNC após a indução da EAE.....	50
<b>Figura 20.</b> Indicador de formação de óxido nítrico no SNC após o tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e GNPs + etilenodicisteína dietil éster (ECD) durante o desenvolvimento da EAE.....	51
<b>Figura 21.</b> Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) sobre o dano em DNA após indução da EAE.....	52
<b>Figura 22.</b> Porcentagem média de imunoexpressão de NF- $\kappa$ B e TGF- $\beta$ na medula espinhal de animais expostos a encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs) e etileno dicisteinodietiléster (ECD) como veículo.....	52
<b>Figura 23.</b> Imagens representativas da análise imuno-histoquímica da medula espinhal de animais expostos à encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs).....	53
<b>Figura 24.</b> Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) no fígado, após a indução da EAE.....	54
<b>Figura 25.</b> Ilustração esquemática sobre os resultados de GNPS (0,6mg/L) e GNPs (0,6ml/g) + ECD no tratamento da EAE.....	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento da EAE.....	28
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO- Antioxidantes  
AMT - transcitose absorção-mediada  
APCs- Células apresentadoras de antígenos  
ARE- Elementos de resposta antioxidante  
BHE- Barreira hematoencefálica  
CAM - Moléculas de adesão celular  
CFA- Adjuvante completo de Freund  
COX- Citocromo C-oxidase  
Cys - Cisteína  
DNA - Ácido Desoxirribonucleico  
ECD - Etilenodicisteína dietil éster  
ECs - Células endoteliais  
ECM- Matriz extracelular  
EM- Esclerose Múltipla  
EM-RR - Recidivante  
EAE- Encefalomielite autoimune experimental  
EO- Estresse oxidativo  
ERN- Espécies reativas de nitrogênio  
EROs- Espécies reativas de oxigênio  
FTIR - Espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier  
GNPs - Nanopartículas de ouro  
GSH- Glutathione  
HLA - Antígeno leucocitário humano  
IFN- Interferon  
IKK - Proteína quinase de I $\kappa$ B  
IL- Interleucina  
IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
iNOS- Óxido nítrico sintase induzida  
LT- Linfócitos T  
MET - Microscopia eletrônica de transmissão  
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade  
MOG- Glicoproteína de mielina dos oligodendrócitos

Mt- *Mycobacterium tuberculosis*

NF-kB - Fator nuclear kappa B

NKs - Células natural killers

NMSS - Comitê Consultivo da Sociedade Nacional de Esclerose Múltipla

NPs - Nanopartículas

Nrf2- Fator relacionado com o fator nuclear E2

ON- Óxido nítrico

PECAM-1- Molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1

PLP- Proteolipoproteína

PP- Progressiva-primária

PR- Progressiva-recidivante

PS- Progressiva-secundária

RMT - Transcitose receptor-mediada

SNC- Sistema nervoso central

SR- Surto-remissão

TC - Técnico

TGF- $\beta$ - Fator de crescimento transformante- $\beta$

Th1- Linfócitos T *helper* tipo 1

Th2- Linfócitos T *helper* tipo 2

Th17- Linfócitos T *helper* tipo 17

TJ- Proteínas de junção (*tight-junctions*)

TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa

Treg- Linfócitos T regulatório

ZO-1- Zônula ocludens

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	13
1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	15
1.3 PATOGÊNESE E MODELO EXPERIMENTAL DA ESCLEROSE MÚLTIPLA....	17
1.4 TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	21
1.5 ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER (ECD).....	22
1.6 NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	23
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.1 GERAL.....	27
2.2 ESPECÍFICOS.....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE).....	28
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE GNP COM ECD.....	29
<b>3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.2 Espectrofotômetro UV-vís.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). .</b>	<b>30</b>
<b>3.2.4 Potencial Zeta.....</b>	<b>30</b>
3.3 ESTUDO PILOTO.....	31
3.4 ESTUDO PRINCIPAL.....	32
3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	32
3.6 WESTERN BLOTTING.....	33
3.7 INDICADOR DE FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	34
3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	34
3.9 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	34
3.10 ENSAIO COMETA.....	35
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPS E ECD.....	38
4.2 ESTUDO PILOTO.....	41
<b>4.2.1 Efeito do tratamento com GNPs e ECD sobre os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.2 Tratamento com GNPs e ECD sobre o infiltrado inflamatório no SNC.....</b>	<b>42</b>



4.2.3 Efeito do tratamento com GNPs e ECD na produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC, após a indução da EAE.....	43
4.2.4 Integridade da bainha de mielina após o tratamento com GNPs e ECD em animais com EAE.....	45
4.3 ESTUDO PRINCIPAL.....	47
4.3.1 Efeito do tratamento com GNPs e ECD sobre os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE.....	47
4.3.2 Efeito do tratamento com GNPs e ECD na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no SNC, após a indução da EAE.....	49
4.3.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM GNPS E ECD NA FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, APÓS INDUÇÃO DA EAE.....	50
4.3.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM GNPS E ECD SOBRE DANO EM DNA, APÓS INDUÇÃO DA EAE.....	51
4.3.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE NF-KB E TGF-B NO TRATAMENTO COM GNPS E ECD APÓS INDUÇÃO DA EAE.....	52
4.3.6 Avaliação da toxicidade no fígado do tratamento com GNPs e ECD, após a indução da EAE.....	53
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	82

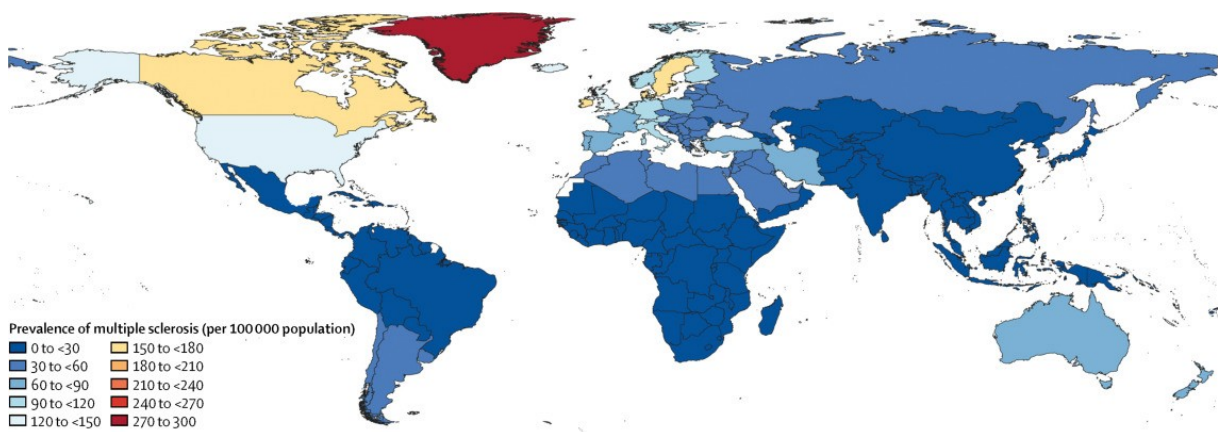
## 1 INTRODUÇÃO

O termo “esclerose” deriva da terminologia grega que significa cicatrização ou rigidez, no caso da Esclerose Múltipla (EM) nas áreas que foi destruída a bainha de mielina no sistema nervoso central (SNC); enquanto que “múltipla” refere-se à condição do número de vezes que se repete a esclerose (Sospedra e Martin, 2005). A EM foi descrita pela primeira vez pelo neurologista francês Jean-Martin Charcot em 1869, como uma doença neuroinflamatória, o qual observou células inflamatórias acumuladas na região perivascular, dentro da substância branca do cérebro e da medula espinhal dos pacientes com disfunção neurológica (McFarland e Martin, 2007). Em 1948, Elvin Kabat observou um aumento de imunoglobulinas (Igs) oligoclonais no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM o que reforçou as evidências da natureza inflamatória da doença (Kabat et al., 1948; Kabat et al., 1950). Em 1878, Louis Ranvier descobriu a bainha de mielina como um revestimento multilamelar glicoprotéico que envolve o axônio no SNC por projeções de oligodendrócitos, e no sistema nervoso periférico (SNP) pelas células de Schwann, e descreveu sua importância no mecanismo de transmissão de sinal do tipo saltatório ao longo dos neurônios (Waxman e Ritchie, 1985; Wingerchuk et al., 2001). Atualmente, sabe-se que a EM é uma doença autoimune neuroinflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC) caracterizada por desmielinização, ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), infiltração de células imunes e lesão axonal, principalmente, na substância branca (Alvarez et al., 2011; Costanza et al., 2012; Lee et al., 2012; Boroujerdi et al., 2013; Wang et al., 2013; Ohl et al., 2016). A desmielinização dos axônios se manifesta quando há bloqueio de condução do impulso nervoso e inflamação permanente (Breckwoldt et al., 2017).

### 1.1 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Embora a etiologia da EM permaneça desconhecida, dados disponíveis sugerem que exista uma combinação de fatores desencadeantes, que podem ser genéticos, autoimunológicos e ambientais, tais como: infecções virais como o Herpes do tipo 6 (Moore e Wolfson, 2002) ou bacterianas como *Chlamydia pneumoniae* (Sriram et al., 1999), toxinas, imunizações, trauma, exposição solar,

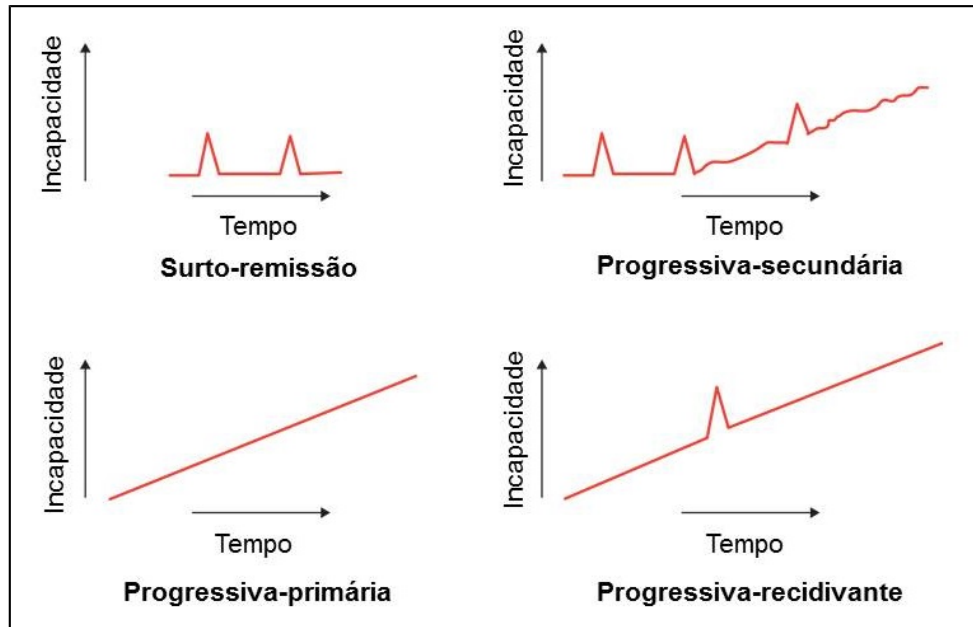
assim como variações hormonais, os quais poderiam justificar o surgimento da doença (Alvarez et al., 2011; Karagkouni et al., 2013). Além disso, os fatores genéticos parecem também contribuir para a incidência da EM (Baranzini et al., 2010). Assim, tanto os fatores genéticos quanto ambientais contribuem para a suscetibilidade da doença. A influência genética é mediada principalmente pelos genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA). Sendo que, o tabagismo, no contexto de certos genes HLA, tem forte influência negativa na suscetibilidade a EM (Hedstrom et al., 2011; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2011). A EM afeta, com maior frequência, mulheres jovens, na faixa etária entre 20 e 40 anos (Lublin e Reingold, 1996; Glass et al., 2010), de maneira lenta e progressiva, afetando 0,05% - 0,15% dos caucasianos (Weiss et al., 2009). Em 2016, houve 2,2 milhões de casos de EM globalmente, o que correspondeu a um aumento de 10,4% desde 1990 (GBD 2016 Neurology Collaborators, 2019). As taxas de prevalência variam de acordo com o continente e a latitude geográfica (Ramirez-Ramirez et al., 2013), sendo mais alta no norte da Europa e a América do Norte (100 ou mais casos por 100.000 habitantes) e menor na região da linha do equador, a prevalência na Ásia é inferior a 30 casos por 100.000 habitantes (GBD 2016 Neurology Collaborators, 2019), como mostra a Figura 1. No Brasil, conforme Pereira et al. (2017), há uma prevalência de 1,36 casos por 100 mil habitantes na região nordeste e de 27,2 casos por 100 mil habitantes na região sul, com uma prevalência média de 8,69 por 100 mil habitantes.



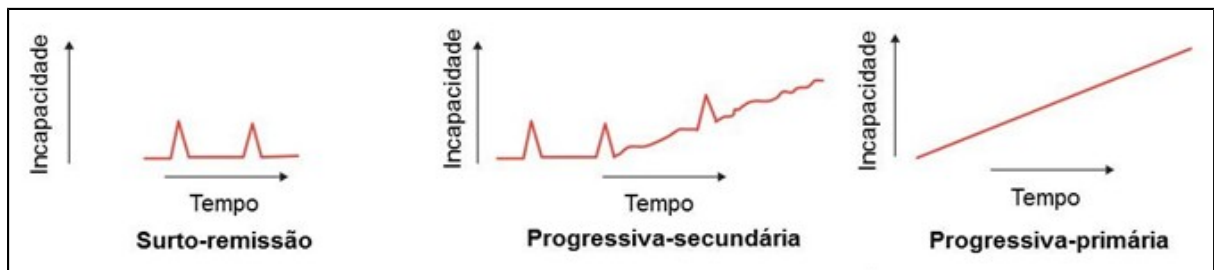
**Figura 1.** Distribuição da Esclerose Múltipla (EM) mundialmente. Imagem adaptada de: GBD 2016 Neurology Collaborators (2019).

## 1.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

A EM possui uma natureza altamente heterogênea e curso clínico imprevisível que se caracteriza por surtos e remissões de sintomas clínicos, com acúmulo gradual de comprometimento, motor ou cognitivo, conforme a recuperação durante a remissão (Lublin et al., 1996). Os surtos, exacerbação ou recidiva, são a ocorrência, a recorrência ou o agravamento de sintomas característicos da doença, com duração igual ou superior a 24 horas. Após o surto, ocorre a estabilização do quadro clínico com recuperação completa ou parcial. Todas as alterações neurológicas que ocorrem em um mês após o surto fazem parte do mesmo evento (Machado et al., 2012). Apesar de todos os pacientes com EM apresentarem sinais de déficit neurológico, existe uma variação considerável nos sinais clínicos e curso da doença entre os indivíduos (Stromnes e Goverman, 2006). O Comitê Consultivo da Sociedade Nacional de EM (NMSS) definiu, em 1996, quatro formas clínicas principais da EM (Figura 2), definidas como: surto-remissão (SR); progressiva-secundária (PS); progressiva-primária (PP) e progressiva-recidivante (PR) (Lublin e Reingold, 1996). No entanto, Lublin e colaboradores (2014) propuseram uma modificação na classificação da EM, dividindo os tipos de EM: Recidivante (EM-RR) e Progressiva (PS e PP) (Figura 3). O tipo mais comum de EM é surto-remissão ou recorrente-remissão, cerca de 80% dos pacientes, caracterizada por surto e remissão, com recuperação completa ou incompleta (Lublin et al., 2014). Sendo que, a maioria dos indivíduos que apresentam a forma de surto-remissão desenvolvem, subsequentemente, a forma progressiva-secundária, devido ao acúmulo de déficits neurológicos (Correale et al., 2014; Dutt e Trapp, 2014).



**Figura 2.** Diferentes cursos clínicos da Esclerose Múltipla (EM) conforme o Comitê Consultivo da Sociedade Nacional de EM. Imagem adaptada de: Lublin e Reingold, 1996.



**Figura 3.** Modificação da classificação dos cursos clínicos da Esclerose Múltipla (EM). Imagem adaptada de: Lublin et al., 2014.

A esclerose múltipla pode ser determinada por meio de episódios clínicos e/ou por aumento das lesões nos exames de imagem, e reflete a existência de um processo neurodegenerativo ou inflamatório ativo (Lublin et al., 2014). Os sintomas clínicos típicos da doença envolvem a deficiência física, cognitiva e sensorial, tais como neurite óptica unilateral, diplopia, distúrbios sensoriais, fraqueza muscular e dos membros inferiores, ataxia, parestesias, dificuldade de coordenação motora e locomoção, desequilíbrios, tonturas/vertigens, hipersensibilidade, perda de memória, déficit de atenção, dentre outras (Bjartmar e Trapp, 2001; Hafler, 2004; Kawakami et al., 2005; Goverman, 2009; Costanza et al., 2012; Dutra et al., 2013a; Dutra et al., 2013b).

### 1.3 PATOGÊNESE E MODELO EXPERIMENTAL DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Estudos em animais tem sido usado para compreender os mecanismos intrínsecos à EM através de um modelo experimental, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), que é caracterizada pela ativação de células mononucleares, principalmente, células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (McFarland e Martin, 2007; Goverman, 2009). Estudos demonstraram, tanto na EAE quanto na EM, que as células T podem ser ativadas em órgãos linfóides periféricos por antígenos virais e/ou bacterianos, os quais apresentam mimetismo molecular com algumas proteínas do SNC, tal como a mielina (Sospedra e Martin, 2005; Broccolo et al., 2013). Outro mecanismo proposto, antígenos, como as proteínas gliais ou neurais, podem drenar para os linfonodos cervicais através do sistema de drenagem linfática (de Vos et al., 2002; van Zwam et al., 2009). Uma vez nos linfonodos cervicais, esses antígenos são apresentados às células T autorreativas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) (Compston e Coles, 2002). Dessa forma, antígenos de mielina e/ou microbianos são fagocitados por células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos e células dendríticas, as quais os apresentam aos linfócitos T *naïve* e induzem a diferenciação e proliferação dos mesmos em linfócitos Th1 e Th17. Esses, em conjunto, contribuem para a patogênese da EM (Yin et al., 2010; Fang et al., 2013; Mangalam et al., 2013).

As células T autoreativas se infiltram no SNC e liberam uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias que ativam os macrófagos, levando à destruição da bainha de mielina (Larochelle et al., 2011). Esta reação autoimune induz um influxo de células pró-inflamatórias através da barreira hematoencefálica (BHE) e estimula as células da microglia a causar as lesões desmielinizantes (Yin et al., 2010; Fang et al., 2013; Mangalam et al., 2013). A ativação crônica das células da microglia facilita o aumento da permeabilidade da BHE, o que aumenta a infiltração de macrófagos periféricos (Boroujerdi et al., 2013). Além disso, a estimulação de linfócitos T helper (Th1) e a síntese de citocinas, como interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-2 (IL-2), induz os linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos. Nesta forma, as células B podem produzir autoanticorpos que são responsáveis pelo processo neurodegenerativo, levando à destruição da bainha de mielina das fibras nervosas (Goverman, 2009). A resposta imune emergente é regulada por subpopulações de linfócitos T, incluindo CD4<sup>+</sup> (Th), CD8<sup>+</sup> (células T

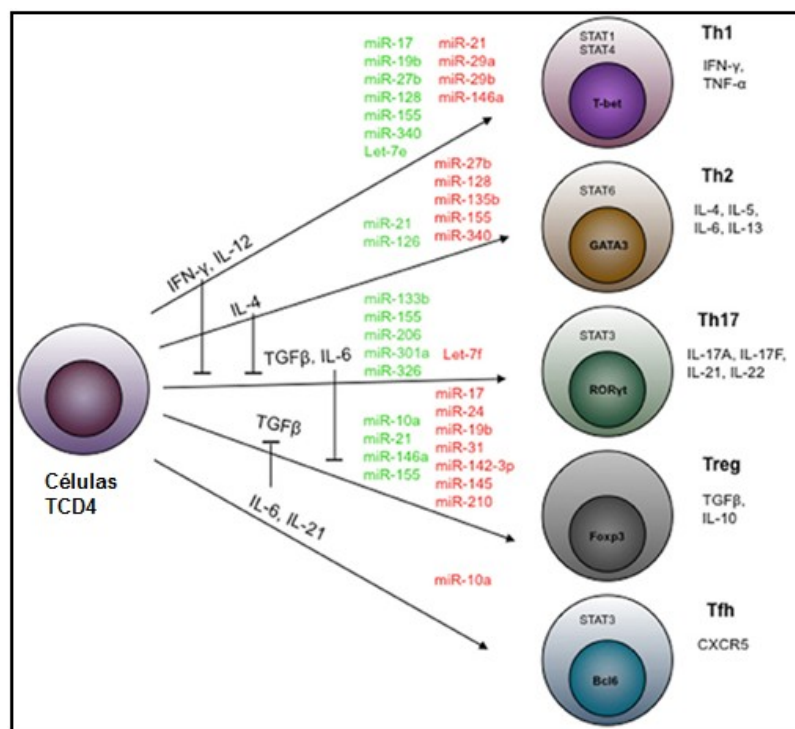
citotóxicas) e células natural killers (NKs) (McFarland e Martin, 2007; Goverman, 2009). O nível de células T regulatórias (Tregs) é o principal responsável pela intensificação da resposta do sistema imunológico. Tregs inibem a produção de anticorpos e de respostas imunes (Ziemssen e Ziemssen, 2005; Dalgas e Stenager, 2012).

O processo de ativação de células T no SNC ocorre em vários estágios através do mecanismo de apresentação de antígenos via moléculas de MHC de classe II na superfície das células dendríticas. Então, as células T reconhecem o complexo do determinante antigênico formado com moléculas de MHC devido ao receptor de células T (Kempuraj et al., 2016). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativos se diferenciam em tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2) e tipo 17 (Th17) como mostra a Figura 4. A interleucina 12 induz a promoção de células Th1, que são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição Tbet, que controla um programa de expressão gênica que resulta na produção de IFN $\gamma$ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e beta (TNF- $\beta$ ), e interleucina 2 (IL-2), que possuem características predominantemente pró-inflamatórias (Becher et al., 2000; Szabo et al., 2003). O fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) é uma das citocinas pró-inflamatórias que desempenham uma função crítica na regulação da proliferação celular, apoptose celular e angiogênese (Gordon et al., 2008). As células Th2 são promovidas por IL-4 e secretam IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 com ação anti-inflamatória. As células Th17, se diferenciam em resposta à ativação do fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), IL-6, IL-21 ou IL-23 e são caracterizadas pela expressão do fator de transcrição ROR $\gamma$ t, produzem principalmente IL-17 e IL-22 (Korn et al., 2009; Miossec et al., 2009), que estão relacionadas ao dano na BHE na EM (Weiss et al., 2009; Alvarez et al., 2011). As células Th1 e Th17 também promovem a ativação de microglias, macrófagos, astrócitos e linfócitos B através da produção de citocinas e fatores de crescimento, ativando mecanismos neurodegenerativos adicionais (Codarri et al., 2011; Ponomarev et al., 2007).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos estão presentes em abundância nas placas inflamadas da EM e perivascular, causando danos a BHE, são também responsáveis pela transsecção axonal e morte do oligodentrócito, auxiliados pelos macrófagos ligados a bainha de mielina (Murphy et al., 2002; Sung et al., 2008). As células T CD8<sup>+</sup> interagem com células que expressam o complexo de

histocompatibilidade de classe I (MHCI), e, também, produzem TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Venters et al., 2000; Mizuno et al., 2008).

A maioria dos mediadores inflamatórios, tais como IL-1 $\beta$ , IL-17, IL-22 e IFN- $\gamma$  são produzidos por leucócitos durante a transmigração, os quais podem afetar a integridade da BHE (Weiss et al., 2009; Alvarez et al., 2011). Na EAE, a realocização da zônula ocludens (ZO-1), a desfosforilação da ocludina e a perda de claudina-3 estão diretamente relacionadas com a progressão da doença (Bénardais et al., 2013).



**Figura 4.** Figura ilustrativa da diferenciação das células TCD4<sup>+</sup>. Imagem adaptada de: Sethi et al., 2013.

As células T efetoras expressam integrinas, permitindo que essas atravessassem a BHE e sejam reativadas por APCs, as quais reapresentam antígenos de mielina no SNC (Klaren et al., 2014). Este tráfego celular é um processo fortemente regulado, associado à ativação das células T e secreção de diferentes quimiocinas, expressão de moléculas de adesão celular e alteração nas proteínas de junção – *tight junctions* (TJ) (Goverman, 2009).

Em condições fisiológicas a BHE exerce papel protetor no SNC, mantendo sua homeostase ao restringir a entrada de células do sistema imunológico e substâncias presentes no sangue, as quais poderiam ser potencialmente lesivas.



Por esta razão, a maioria dos imunologistas define o SNC como um tecido com “privilégios imunológicos” (Alvarez et al., 2011; Pfeiffer et al., 2011). Essa restrição depende tanto das células endoteliais microvasculares do SNC, como das proteínas de junção (TJ), por exemplo: claudina-3, claudina-5 e ZO-1, as quais regulam a entrada e saída de substâncias no encéfalo (Pfeiffer et al., 2011). No entanto, as células T ativadas e de memória expressam moléculas de adesão endoteliais (integrinas e selectinas), receptores de quimiocinas e integrinas, que lhes permitem atravessar essas barreiras (Goverman, 2009; Weiss et al., 2009; Bénardais et al., 2013). A molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1), também conhecida como CD31, está localizada nas células endoteliais, paralela a *tight-junctions* (TJ), considerada importante para a migração de leucócitos através do endotélio (Zlokovic, 2008). De fato, a superexpressão de moléculas de adesão de leucócitos em células endoteliais (ECs), tais como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina e P-selectina, tem sido documentada em lesões cerebrais de pacientes com EM (Weiss et al., 2009). Na EAE, a relocação de ZO-1, a desfosforilação da ocludina e a perda de claudina-3 estão diretamente relacionadas com a progressão da doença (Bénardais et al., 2013). Além disso, atualmente, acredita-se que, a ruptura da permeabilidade da BHE depende, pelo menos em parte, da ação de proteases, tais como metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), as quais degradam a matriz extracelular (ECM), como lamininas, colágeno tipo IV e fibronectina, bem como as proteínas de junção (Boroujerdi et al., 2013), contribuindo, assim, para a progressão da doença.

O SNC é particularmente susceptível a danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (ERO), devido a uma maior exigência de oxigênio no cérebro, baixa concentração de enzimas antioxidantes, alta concentração de ácidos poli-insaturados - componentes essenciais de fosfolípidos da membrana celular - e alta densidade de mitocôndrias (Kovacic e Somanathan, 2012; Miller et al., 2013; Penta et al., 2013). Esse cenário é favorável ao estresse oxidativo (EO), dado à transtornos metabólicos e diminuição das defesas antioxidantes (AO) (Kovacic e Somanathan, 2012). A excessiva liberação de radicais livres pode desempenhar papel importante na patogênese da EM e favorecer a migração trans-endotelial de leucócitos, particularmente, linfócitos T autorreativos (Grecchi et al., 2012; Lee et al., 2012). Nos últimos anos, diferentes grupos de pesquisa obtiveram evidências experimentais, indicando que o EO desempenha papel fundamental na patogênese da

desmielinização inflamatória (Gilgun-Sherki et al., 2004; Haider et al., 2011; Neher et al., 2011; Oliveira et al., 2012; Christensen et al., 2013; Dasgupta et al., 2013; Seven et al., 2013; Souza et al., 2017). Diversos estudos analisaram a desmielinização induzida por radicais livres em pacientes com EM, através de métodos bioquímicos, como oxidação de nucleotídeos, proteínas e lipídeos (Van Horssen et al., 2011; Grecchi et al., 2012; Lee et al., 2012). Entre as fontes de EROs podem-se destacar os macrófagos e microglia ativados (Fischer et al., 2012; Kovacic e Somanathan, 2012; Lee et al., 2012).

Conforme um estudo realizado por Souza et al. (2017), há um aumento nos níveis de óxido nítrico (ON), diminuição do conteúdo de GSH na medula espinhal, linfonodo e hipocampo, assim como um aumento de danos oxidativos em proteínas e lipídios de membrana nos animais com EAE. A ativação de monócitos e macrófagos, assim como microglia, produzem diferentes mediadores inflamatórios, incluindo óxido nítrico (ON) e ERO, os quais contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença (Benveniste, 1998; Fischer et al., 2012; Kovacic e Somanathan, 2012; Lee et al., 2012). Essa geração de ERO no parênquima cerebral contribui para a lesão persistente, devido ao dano em oligodendrócitos e axônio, além da redução dos níveis séricos de antioxidantes (Gilgun-Sherki et al., 2004; Van Meeteren et al., 2005; Witherick et al., 2011).

#### 1.4 TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Os tratamentos medicamentosos com imunomoduladores e imunossupressores disponíveis para EM visam reduzir a frequência e gravidade da recidiva da doença, atraso na progressão da doença, diminuir o número de lesões no SNC e manter ou melhorar a qualidade de vida dos pacientes (Lublin et al., 2014). Dentre eles, destacam-se os interferons (IFN- $\beta$ ), acetato de glatiramer, mitoxantrona, natalizumab, e uma nova série de medicamentos orais (Fingolimod e Dimetil fumarato), que reduzem ou melhoram a progressão da doença (Castro-Borrero et al., 2012; Chanvillard et al., 2013; Ladeira et al., 2019), todos estão associados com o surgimento de efeitos adversos significativos, incluindo depressão, susceptibilidade aumentada à infecção, cardiotoxicidade, náuseas, anemia, dentre outros (Castro-Borrero et al., 2012; Ladeira et al., 2019). Além disso, a maioria dos medicamentos disponíveis no mercado para o tratamento da EM são

imunossupresores, diminuem o risco de recaída, mas exercem efeitos limitados em retardar a progressão da doença (Chanvillard et al., 2013; Khalaj et al., 2013; He et al., 2013). No Brasil estes medicamentos são distribuídos gratuitamente pelo governo através de farmácias de dispensação de alto custo ou em centros públicos de referência do tratamento da EM mediante relatório médico que confirme a existência da doença (ABEM, 2019).

Aliado ao tratamento medicamentoso, a reabilitação é de extrema importância para a prevenção e recuperação, quando possível, de complicações decorrentes da doença. Como a EM é uma doença crônica e incapacitante, a reabilitação torna-se importante na manutenção do estilo de vida independente e favorece a melhora na qualidade de vida dos portadores. O exercício é bem tolerado e induz benefícios pertinentes, tanto no funcionamento físico, quanto mental, dos pacientes com EM (Dalgas e Stenager, 2012), e o agravamento dos sintomas está associado com níveis mais baixos de atividade física (Motl et al. 2008; 2011). Um estudo realizado por Souza et al. (2017) mostrou que o treinamento de força e aeróbio melhoram os sinais clínicos de EAE, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-1 $\beta$  na medula espinhal de camundongos com EAE, além da preservação das junções oclusivas da BHE.

Ressalta-se que até o presente momento, não existe tratamento que determine a recuperação total do sistema neural danificado (He et al., 2013; Batcheller e Baker, 2019). Por esta razão, a procura por terapias específicas apresenta grande relevância para a descoberta de novas opções terapêuticas para o tratamento da EM. Assim, a hipótese deste trabalho é que a associação do ECD com as GNPs possa apresentar efeito positivo imunomodulador durante o desenvolvimento e progressão da EM.

### 1.5 ETILENODICISTEÍNA DIETIL ÉSTER (ECD)

A medicina nuclear ao longo de décadas desenvolveu fármacos com propriedades químicas e biológicas excepcionais, sendo estes, carreadores de radionuclídeos para fins de identificação de processos fisiológicos em organismos vivos e terapia, principalmente nos seres humanos. Estes fármacos possuem alta afinidade e biodisponibilidade para determinados sítios biológicos, o que seria

potencialmente útil para o carreamento, também, de substâncias não radioativas com propriedades terapêuticas (Carlson, 1995).

Um dos fármacos de medicina nuclear que se destaca quando se avalia o SNC é o etilenodicisteína dietil éster (ECD). O ECD atravessa a BHE íntegra por difusão passiva em razão direta ao fluxo sanguíneo cerebral, após esta etapa o composto sofre desesterificação e perde suas características lipofílicas, fixando-se desta forma ao encéfalo. As enzimas arilesterase e carboxilesterase são sugeridas como as enzimas que promovem a hidrólise do ECD no SNC a monômero de etilcisteinato (Vallabhajosula et al., 1989; Tanaka et al., 2000; Inoue et al., 2001).

Na prática, o ECD é utilizado associado ao tecnécio (TC), que é um radiofármaco destinado a cintilografia de perfusão cerebral. O bisisato ( $^{99m}\text{TC}$ ) é um radiofármaco utilizado para avaliação da doença vascular cerebral isquêmica, hemorrágica e do risco pré-operatório, localização e laterização pré-operatória de foco de epilepsia, avaliação da suspeita de demência, tais como doença de Alzheimer, demência de corpos de Lewy, doença de Parkinson, avaliação de traumatismo craniano, avaliação de suspeita de inflamação cerebral e diagnóstico de morte cerebral (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, 2011). Nesse contexto, o ECD pode auxiliar na entrega de GNPs para o SNC.

## 1.6 NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro (GNPs) tem apresentado potencial no tratamento de doenças do SNC, a exemplo da EM (Kanwar et al., 2012). As GNPs podem ser facilmente sintetizadas, pois são quimicamente estáveis (Kanwar et al., 2012) e geralmente mostram baixa imunogenicidade e toxicidade (De Jong e Borm, 2008). O núcleo de ouro é inerte, mas interage com material biológico e pode ter efeitos biológicos. Para abordar esta questão, foram investigados uma variedade de tamanhos e modificações de superfície que afetam o comportamento específico das nanopartículas (Chen et al., 2009). As nanopartículas esféricas de ouro foram preparadas em vários tamanhos - para aplicações biológicas, a maioria das nanopartículas usadas têm diâmetros de 1,5 - 20 nm. O tamanho determina quantos átomos na superfície da nanopartícula têm a capacidade de reagir com uma molécula e formam uma ligação covalente (Male et al., 2016). As diversas nanopartículas e protocolos utilizados nos diferentes estudos dificultam a

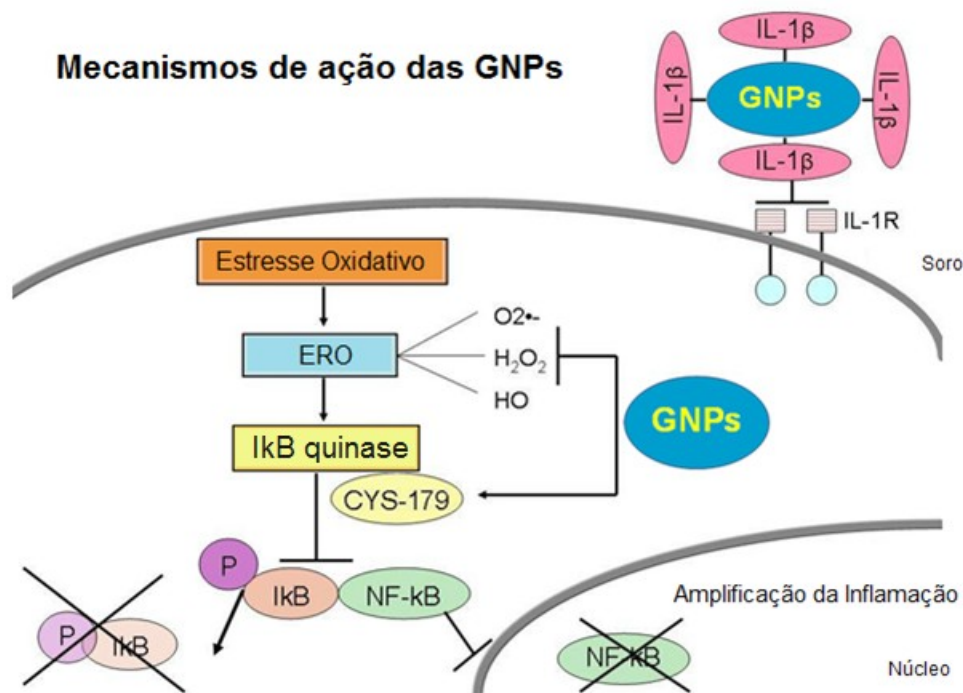
generalização, mas o tamanho das nanopartículas e os revestimentos superficiais têm um grande efeito sobre sua biodistribuição. Para as nanopartículas (NPs) de 10nm, níveis de 0,2% da dose injetada foram encontrados no cérebro após 24 h. Para NPs maiores (50 e 250 nm), os níveis no cérebro foram muito baixos, e uma alta proporção foi absorvida por células fagocíticas no fígado e baço (Khlebtsov e Dykman, 2011). O revestimento superficial de GNPs foi inicialmente utilizado para estabilizar as nanopartículas e/ou aumentar a sua capacidade de atravessam a BHE. Trabalhos prévios descobriram que GNPs revestidas com glicose ou glutathione (<5 nm de diâmetro) entram no endotélio do cérebro humano e não são tóxicas ao longo de 24 h em concentrações de até 32 µg/mL (Gromnicova et al., 2013).

As aplicações das GNPs no SNC são dependentes de carreadores eficazes que atravessem a BHE. Assim, as GNPs possuem discreta capacidade de atravessar a BHE conforme o seu tamanho, sendo que partículas menores atravessam a BHE com maior facilidade. Este transporte é realizado principalmente por transcitose absorção-mediada (AMT) e transcitose receptor-mediada (RMT), associados a gasto de energia (Sela et al., 2015). Dependendo do tamanho, forma, composição, superfícies e estado de agregação das NPs, elas são capazes de atravessar a BHE ou produzir efeitos tóxicos. Devido ao seu tamanho muito pequeno, algumas GNPs podem facilmente chegar ao cérebro e ser absorvidas pelas células cerebrais (Asharani et al. 2009). Há evidência de que as GNPs poderiam alcançar e se acumular no parênquima cerebral, incluindo o estriado e o hipocampo. Pequenas nanopartículas (<10 nm) podem atravessar as células endoteliais do cérebro eficazmente *in vitro* e *in vivo* utilizando uma combinação de vias de transporte vesicular citosólicas. O núcleo de ouro apresenta uma interação mínima com as moléculas biológicas e, conseqüentemente, tem uma citotoxicidade e imunogenicidade muito baixas (Male et al., 2016).

Além disso, existem outras maneiras de administração, como a via nasal, na qual a administração é simples e tem ação rápida do fármaco, no entanto, a entrega eficaz de fármacos através desta via é desafiadora, visto que normalmente requer dosagens líquidas de elevado volume ou formulações apropriadas; e a via de administração intratecal (Arora et al., 2002; Sintov et al., 2010; Ugwoke et al., 2005).

Estudos demonstram que as GNPs podem ativar a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB), que é conhecido por desempenhar um papel significativo em processos fisiológicos e patológicos que incluem proliferação celular,

sobrevivência, angiogênese, respostas imunes e inflamação (Vallabhapurapu e Karin, 2009; Ling e Kumar, 2012). As GNPs quando estabilizadas com citrato regulam negativamente as respostas celulares induzidas pela IL-1 $\beta$  e impede que IL-1 $\beta$  se ligue ao seu receptor IL-1R (Sumbayev et al., 2013). A produção reduzida de citocinas inflamatórias (INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) pelos GNPs pode ser resultado da supressão do NF- $\kappa$ B (poderia inibir a translocação do núcleo de NF- $\kappa$ B através de uma redução na fosforilação de IKK- $\beta$ ), o principal fator de transcrição responsável por produção de citocinas sob condições patológicas (Norton et al. 2008; Khan e Khan, 2018). Outro estudo mostrou que as GNPs bloqueiam a ativação do NF- $\kappa$ B interagindo com o componente cys-179 resíduo de IKK- $\beta$  e, com isso, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Jeon et al., 2003), como mostra a Figura 5.



**Figura 5.** Figura ilustrativa dos possíveis mecanismos de ação das nanopartículas de ouro (GNPs). As GNPs regulam negativamente as respostas de IL-1 $\beta$  e não impede que IL-1 $\beta$  se ligue ao seu receptor IL-1R no plasma; inibem a produção de ERO e conseqüentemente a cascata decorrente do estresse oxidativo, não permitindo que I $\kappa$ B Quinase sinalize a I $\kappa$ B e fosfato e também não permite a ativação de NF- $\kappa$ B se transcreva para o núcleo celular. Assim a GNPs permite que CYS-179 se ligue a I $\kappa$ B quinase, promovendo a inibição de fosforilação de serinas. Estes mecanismos de ação das GNPs podem confirmar a alta capacidade de interação com as células e evidencia o seu promissor efeito anti-inflamatório.

Estudos mostraram que o tratamento com GNPs apresentam propriedades medicinais anti-inflamatórias e antioxidantes (Tsai et al., 2007; Barathmanikanth et al., 2010; Silveira et al., 2016; de Carvalho et al., 2018). Conforme Silveira et al.,

(2014), os efeitos da iontoforese com a GNPs, assim como Zortéa et al., (2015), Dohnert et al. (2015) e Silveira et al. (2016) mostraram os efeitos da fonoforese com GNPs, reduziram a produção de oxidantes, danos oxidativos e a resposta inflamatória, além de melhorar o sistema de defesa anti-oxidante nos animais. Conforme Paula e colaboradores (2015), a associação entre GNPs e N-acetilcisteína reduz a resposta inflamatória local induzida por carragenina. Em um modelo experimental de doença de Alzheimer, foi observado que o tratamento de GNP evitou a neuroinflamação e o estresse oxidativo, além de ter um efeito positivo no tratamento de demência (Muller et al., 2017).

Neste contexto, o uso do ECD como carreador de GNPs poderia viabilizar ou potencializar os efeitos destas no SNC, com possível ação terapêutica prolongada em doenças neurodegenerativas e inflamatórias, como a EM (Vallabhajosula et al., 1989; Cattelotte et al., 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar os efeitos das GNPs ligadas ao ECD no SNC em animais expostos a um modelo experimental de EM.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos estão divididos em estudo piloto e estudo principal, a saber:

#### Estudo Piloto

- ✓ Caracterizar quimicamente a interação entre GNPs e ECD;
- ✓ Verificar os efeitos de diferentes concentrações de GNPs e GNPs + ECD sobre parâmetros clínicos e inflamatórios na medula dos animais expostos ao modelo de EAE;
- ✓ Verificar a integridade da bainha de mielina após o tratamento com GNPs e GNPs + ECD nos animais expostos ao modelo de EAE;
- ✓ Determinar a concentração mais efetiva de GNPs (0,3, 0,6 ou 1,0mg/L) + ECD em animais expostos ao modelo de EAE.

#### Estudo Principal

- ✓ Avaliar os efeitos das GNPs ligadas ao ECD sobre os parâmetros clínicos durante o desenvolvimento da EAE;
- ✓ Avaliar o efeito imunomodulatório das GNPs ligadas ao ECD sobre mediadores pró e anti-inflamatórios produzidos no SNC através da técnica de Elisa e imunohistoquímica;
- ✓ Avaliar os efeitos das GNPs ligadas ao ECD sobre o conteúdo de ON na medula espinhal;
- ✓ Avaliar os efeitos das GNPs ligadas ao ECD sobre o dano em DNA, no SNC e sangue, através do ensaio cometa;
- ✓ Avaliar os efeitos das GNPs ligadas ao ECD sobre a toxicidade no fígado através da análise histológica.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A tese está organizada em dois estudos. O primeiro estudo refere-se ao estudo piloto que teve como propósito caracterizar quimicamente a interação entre GNPs e ECD e verificar os efeitos de diferentes concentrações de GNPs sobre parâmetros clínicos e inflamatórios na medula dos animais expostos ao modelo de EAE. A partir do estudo piloto, um segundo estudo foi conduzido, denominado aqui como estudo principal, que teve como propósito verificar os efeitos de uma determinada concentração de GNPs ligada ao ECD sobre parâmetros neuroinflamatórios e toxicidade no fígado. Ambos os estudos estão detalhados separadamente nesta seção bem como na seção de resultados. Uma discussão geral foi elaborada considerando os achados dos dois estudos.

#### 3.1 ENCEFALOMIELEITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL (EAE)

A EAE foi induzida com inoculação de 200  $\mu$ L de emulsão contendo 200  $\mu$ g de glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG<sub>35-55</sub>) em adjuvante completo de Freund (CFA), suplementado com 500  $\mu$ g de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) H37Ra (Difco, Detroit, MI, USA) em ambos os flancos traseiros. Em adição, cada animal recebeu 300 ng de *Bordetella toxina pertussis* em 100  $\mu$ L de solução salina por via intraperitoneal no dia 0 e no dia 2 após indução da EAE (Racke, 2001). Os animais foram avaliados todos os dias até o 25º dia após a indução da EAE, e os sintomas da doença foram determinados por estágios (Stromnes e Goverman, 2006) como mostra a tabela 1:

**Tabela 1.** Avaliação dos sinais clínicos dos animais durante o desenvolvimento da EAE.

<b>Escore</b>	<b>Sinais Clínicos</b>
0	Sem sinais clínicos
1	Perda do tônus da cauda
2	Fraqueza dos membros posteriores e dificuldade de endireitamento
3	Paralisia dos membros posteriores e fraqueza dos membros anteriores
4	Tetraplegia
5	Morte

Após as análises dos sinais clínicos todos os animais foram anestesiados

através da administração intraperitoneal de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e submetidos à morte por decapitação em guilhotina, o sangue e órgãos como fígado e medula espinhal foram cirurgicamente removidos e armazenados em freezer - 80°C até a execução das análises.

### 3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE GNP COM ECD

As GNP foram preparadas como descrito por Victor et al. (2012). Uma solução de citrato de sódio (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO) foi adicionada a uma solução de ácido cloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) (Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, MO) previamente aquecida a 90°C. Após adição do agente redutor (citrato de sódio) o sistema foi mantido em refluxo por cerca de 20 minutos. A reação foi monitorada por espectroscopia de UV-vis, utilizando um espectrômetro Shimadzu, modelo UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O surgimento de uma banda com absorção máxima em 520 nm, atribuída a uma banda de superfície de plasmon ressonante (SPR), é típica de nanopartículas de ouro de geometria esférica. O tamanho de partícula foi determinado utilizando-se análise por difração de raios X (DRX) empregando-se um difratômetro de raios X da Shimadzu, modelo XDR-6000 com Cu Ka radiação ( $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ , 30 kV, 30mA). A taxa de varredura foi de 2°/min, com  $\theta$  variando entre 20-80°. O diâmetro médio de partícula esperado é de cerca de 10nm e foi calculado a partir do respectivo difratograma de raios X, utilizando a equação de Scherer (Yan et al., 2005). A concentração de Au na solução foi determinada por análise de absorção atômica em um espectrofotômetro de absorção atômica VARIAN A modelo 240Z AA (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, EUA). Depois de caracterizadas, as nanopartículas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e então o pelete ressuspendido em água ultrapura. O procedimento foi repetido 3x para remoção do excesso de citrato, que atua não só como redutor, mas também como estabilizante. O ECD foi diluído em atmosfera inerte, com diluente apropriado e transferido com auxílio de uma seringa para um frasco contendo solução de GNPs desoxigenada previamente com argônio ultrapuro. Após a adição dos traçadores, alíquotas do meio reacional foram retiradas e os espectro eletrônico foi registrado, até manter-se constante. Um deslocamento batocrômico da banda de SPR é indicativo de que a reação se processou,

demonstrando que o ECD se ligam às GNPs, tendo em vista o deslocamento no comprimento de onda na máxima absorção de 520 nm para cerca de 650 nm.

### **3.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para análise da morfologia e estimativa do tamanho médio das GNPs utilizou-se a técnica microscopia eletrônica transmissão da marca JEOL, modelo JEM 2100F de 100kV, que se encontra alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Na preparação das amostras, uma gota da solução de GNPs e ECD+GNPs foi adicionada em um grid contendo carbono (grid de cobre, 300 mesh). Após o tempo de secagem dos grids (24hrs), as imagens foram obtidas.

### **3.2.2 Espectrofotômetro UV-vís**

Análises foram realizadas na região do ultravioleta e visível (450 – 650 nm). As amostras de GNPs e ECD+GNPs foram diluídas em água destilada e adicionada (2ml) em uma cubeta de vidro para posterior varredura. Todas análises foram realizadas em triplicata.

### **3.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

As análises de FTIR foram realizadas em espectrômetro Agilent Technologies (Cary 600 Series) na Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório Controle de Processo. Para obtenção dos espectros, amostras de GNPs e ECD+GNPs secas a 60°C foram incorporadas em KBr, seguido da compressão para formação de pastilhas. As análises foram conduzidas com varreduras na faixa de 4000 - 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.2.4 Potencial Zeta**

Estas medidas foram determinadas utilizando-se um equipamento Malvern 3000 Zetasizer Nano ZS, (Malverne Instruments, UK), locado na Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório Controle de Processo. As análises do

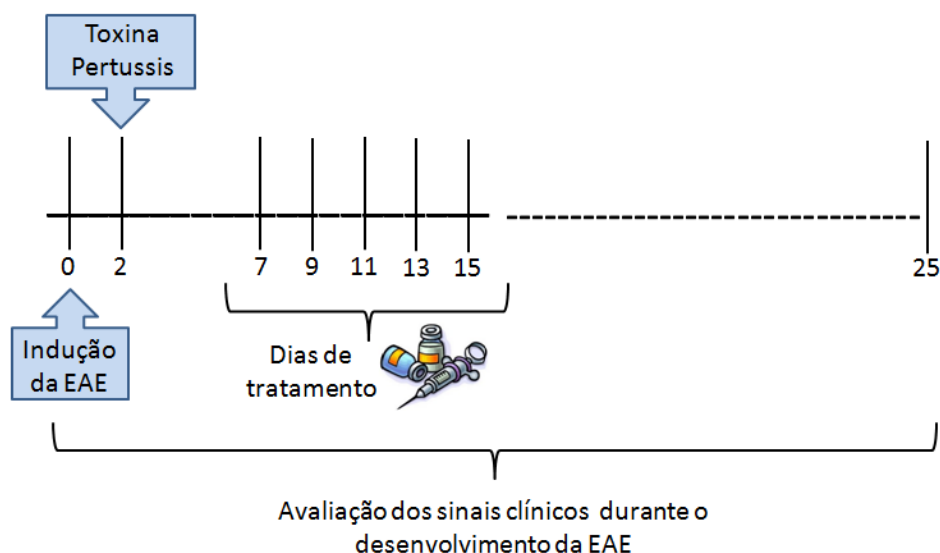
potencial zeta forma realizadas com as GNPs e ECD+GNPs sem diluir as amostras. As análises foram realizadas em triplicata.

### 3.3 ESTUDO PILOTO

A abordagem aqui empregada é inovadora e, portanto, não há definição na literatura para uma dose de GNPs/ECD a ser ministrada. As doses de 2,5mg/L de GNPs (sem o ECD) injetadas por via intraperitoneal (i.p.) tem efeito biológico e não apresenta toxicidade (Muller et al., 2017a e b). Conforme Tartuce et al. (2017), doses de 0,3, 0,7 e 1,0mg/L de nano+MIBI promovem regulação do estresse oxidativo no coração de ratos infartados. Em relação ao ECD, de acordo com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen, 2016), testes de tolerância toxicológica realizado em camundongos não provocaram reação adversa no organismo dos animais numa dose equivalente a 1000 vezes superior a maior dose administrada em adulto humano de 70 kg, no período de observação de 72 horas. Entretanto, a associação com ECD pode alterar essas propriedades e, portanto, merecem ser definidas antes de empregar no estudo. Neste sentido, foi proposto o desenvolvimento de um modelo piloto para determinação da concentração da dose da GNPs.

Foram utilizados 50 camundongos C57BL/6 fêmeas pesando entre 20-25g (8 semanas de idade) obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas com ventilação, controle de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (60 – 80 %) em ciclo de 12h claro-escuro, com livre acesso à água e ração. Os procedimentos empregados no presente estudo foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e aprovado sob o parecer de número 037/2016-2 (Anexo 1).

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=10): EAE + veículo (ECD); EAE + GNPs (1,0mg/L); EAE + GNPs (0,3mg/L) + ECD; EAE + GNPs (0,6mg/L) + ECD; EAE + GNPs (1,0mg/L) + ECD. Após 25 dias da indução da EAE os animais foram eutanasiados. Sete dias após a indução da EAE, os animais receberam 5 doses de GNPs e/ou ECD por administração intraperitoneal em dias alternados, como mostra a Figura 6.



**Figura 6.** Desenho experimental. Imagem obtida pelo autor.

### 3.4 ESTUDO PRINCIPAL

Após determinação da dose de GNPs com ECD, 7 dias após a indução da EAE, os animais receberam 5 doses de GNPs e/ou ECD por administração i.p. em dias alternados, como mostra a Figura 6 (projeto piloto). Foram utilizados 36 camundongos C57BL/6 fêmeas pesando entre 20–25g (8 semanas de idade) obtidos do Biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram mantidos em gaiolas isoladas com ventilação, controle de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade (60 – 80 %) em ciclo de 12h claro-escuro, com livre acesso à água e ração. Os procedimentos empregados no presente estudo foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e aprovado sob o parecer de número 037/2016-2 (Anexo 1).

### 3.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

Após 25 dias de indução da EAE, os animais foram eutanasiados, e a medula espinhal coletada para a avaliação da expressão de citocinas. Os níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4, IL-17, IL-10 e IL-1 $\beta$  foram determinados por *kit* comercial de

citocinas (ELISA) (ReD Systems), de acordo com os procedimentos recomendados pelo fabricante.

### 3.6 WESTERN BLOTTING

A medula espinhal foi extraída e homogeneizada em tampão específico contendo 1% de Triton X 100, 100 mM de Tris (pH 7,4), 100 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de EDTA, 10 mM de vanadato de sódio, 2 mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina à 4°C. O homogeneizado foi centrifugado a 11.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais, utilizando o método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, as proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão de Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT e, posteriormente, realizada a determinação do *imunoblot* com anticorpos específicos. Para isso, alíquotas contendo 250 µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. As proteínas separadas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *BioRad*. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução de bloqueio (5% de albumina; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0,02% de Tween 20) por 2 h, à temperatura ambiente, a fim de reduzir a formação de reações inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: mielina (1:1000, Merck KGaA) e PLP (1:1000, ThermoFischer), sob agitação constante, *overnight* à 4°C. A seguir, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2h à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por 2min em substrato enzimático (Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos da América) e expostas ao filme de RX em cassete de revelação autoradiográfica. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das auto-radiografias reveladas por densitometria ótica (DO), utilizando *scanner* (HP 3400), com posterior processamento no *software Scion Image®* (Scion Corporation) (Laemmli, 1970; Bradford, 1976). A membrana foi estripada e reblotada para actina (Santa Cruz, CA, EUA), usada como proteína controle.

### 3.7 INDICADOR DE FORMAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico (ON) foi avaliada espectrofotometricamente (Espectrofotômetro - Shimadzu) através do metabólito estável nitrito. Para mensurar o conteúdo de nitrito, a medula espinhal foi incubada com reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de N-1 (naphthyl) ethylenodiamina) em temperatura ambiente por 10 min, seguido de leitura em 540 nm no espectrofotômetro. O conteúdo de nitrito foi calculado a partir da curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) - 0 a 100 nM. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  nitrito/mg proteína (Chae et al., 2004).

### 3.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Vinte e cinco dias após a indução da EAE, os animais foram anestesiados e perfundidos com solução de paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As medulas espinhais e fígado foram removidas e pós-fixadas por 24h na mesma solução (PFA 4%), e em seguida embebidas em parafina após desidratação e diafanização, e seccionadas em cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura. As análises histológicas dos focos inflamatórios foram realizadas com hematoxilina-eosina (H&E). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Eclipse 50i, Nikon, Melville, NY, EUA).

### 3.9 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Áreas representativas da medula espinhal foram transferidas do bloco histológico para um bloco de *tissue microarrays* (TMA). Em seguida, duas secções embebidas em parafina de 4  $\mu\text{m}$  de espessura dos blocos TMA foram transferidas para lâminas Star Frost <sup>TM</sup> (Braunschweig, Alemanha) carregadas eletricamente e incubadas com um anticorpo primário de IL 17 (ab797; 1: 200; Abcam, Cambridge, Reino Unido), NFK- $\beta$  (ab7971; 1:200; ABCAM; Cambridge; UK) e TGF- $\beta$  (E11262; 1:200; Spring; Cambridge; UK) durante a noite em uma câmara umidificada a uma temperatura entre 2-8°C. Em um sistema de detecção polivalente de HRP-DAB-Spring Bioscience <sup>TM</sup> (Pleasanton, CA, EUA, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário por 30 minutos à temperatura ambiente. As reações imunes

foram desenvolvidas pela adição de solução de cromogênio-substrato DAB (Spring) às lâminas. A hematoxilina Harris foi utilizada para a contra coloração. Controles positivos e negativos foram realizados em paralelo com todas as reações. As lâminas foram digitalizadas usando o scanner Axio Scan.Z1 (Carl Zeiss, Alemanha). Os arquivos gerados foram fragmentados em imagens únicas e aproximadamente 25 imagens foram selecionadas para análise. As áreas de imunopositivos foram quantificadas usando o software Image-Pro Plus versão 4.5 (Media Cybernetics, EUA). Os resultados imunopositivos foram selecionados usando uma “máscara” para padronizar e automatizar o processo. Os dados numéricos da área de marcação imunopositiva foram gerados e posteriormente exportados para uma planilha do Excel (Harvey et al. 1999).

### 3.10 ENSAIO COMETA

O ensaio cometa (EC) foi realizado sob condições alcalinas, conforme descrito por Singh et al. (1988), com algumas modificações sugeridas por Tice et al. (2000).

O sangue foi coletado e colocado em microtubos heparinizados e refrigerados, e as amostras de medula espinhal, foram dissecadas e imersas em tampão Merchant's refrigerado. Em seguida elas foram individualmente homogeneizadas com o auxílio de uma seringa, através do movimento de vai e vem, a fim de obter uma suspensão celular.

As células do sangue (alíquotas de 5µL) e as células obtidas da dissociação da medula espinhal (alíquotas de 25µL) foram embebidas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%, w/v, 95µL ou 75µL, respectivamente). A mistura foi adicionada a uma lâmina de microscópio pré-coberta com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), coberta posteriormente com uma lamínula e levada, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos a 4°C para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, EDTA 100mM e Tris10mM, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 1 semana.

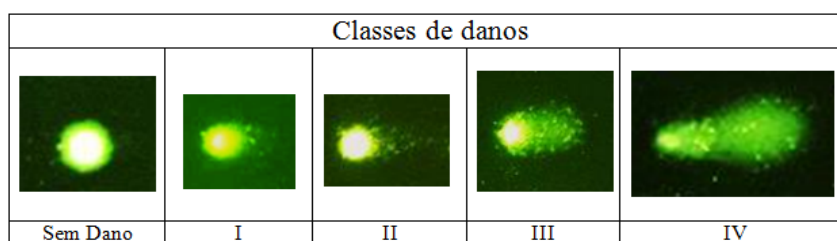
As lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH300mM e EDTA1mM, pH>13) por 20 minutos para o desenovelamento do DNA, a corrida



eletroforética, foi realizada no mesmo tampão nas seguintes condições: a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta fraca amarela. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado Syber Gold (Sigma Brasil, 1239-45-8) para posterior análise.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo e por tecido (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda considerada 0, até 4 para o comprimento máximo de cauda (Collins et al., 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada animal variando de zero ( $100 \times 0 = 0$ ; 100 células observadas completamente sem danos) a 400 ( $100 \times 4 = 400$ ; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda.

As diretrizes internacionais e recomendações para o ensaio do cometa consideram que o escore visual de 100 cometas é um método de avaliação bem validado. Ele tem uma alta correlação com a análise de imagem por computador (Collins et al., 1997). Foram utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento (Figura 7). Todas as lâminas foram codificadas para análise às cegas.



**Figura 7.** Classes de Danos em DNA.

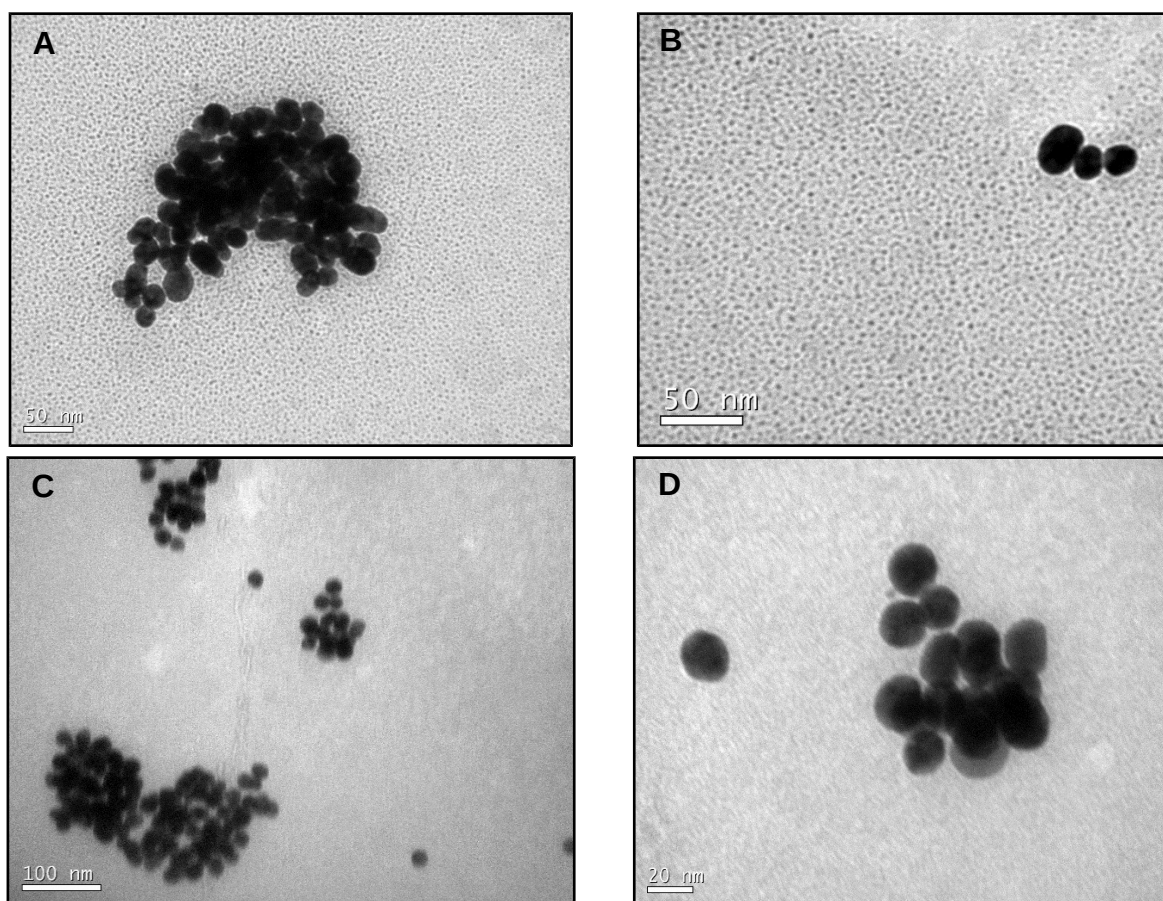
### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram avaliadas utilizando ANOVA de uma via, seguida do teste de Neuman-Keuls ou de Tukey para comparações múltiplas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados com significância estatística. Foi utilizado o *software* GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) para as análises estatísticas.

## 4 RESULTADOS

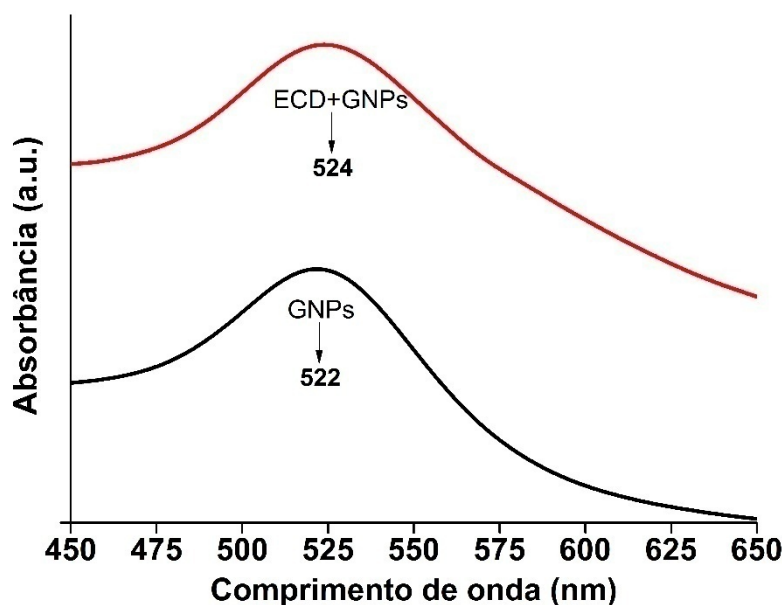
### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS GNPs E ECD

Com objetivo de avaliar as propriedades físico-química das GNPs e possíveis interações físico-químicas com o ECD, análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectrofotometria por UV-vis e espectroscopia por infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e análise de potencial zeta foram realizados. A partir das análises de MET (Figura 8), pode ser observado que as GNPs (Figura 8A e B) apresentaram um tamanho na faixa de 10-20nm e morfologia esférica. A incorporação do ECD nas GNPs (Figura 8C e D) não alterou o tamanho (10nm) e a morfologia das GNPs.



**Figura 8.** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de ouro (GNPs) (A-B) e das GNPs + ECD (etilenodicisteína dietil éster) (C-D).

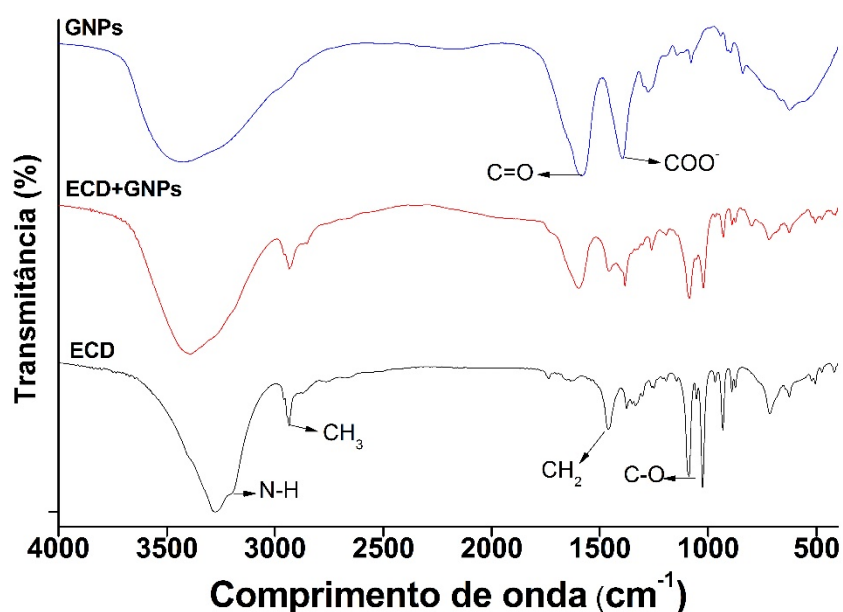
A evidência da funcionalização da superfície das GNPs pelos íons citrato e possíveis interações físico-química das GNPs e ECD, foram analisadas via espectrofotometria por UV-vís e FTIR. Como pode ser visto na análise de UV-vís (Figura 9), a presença da banda de absorção máxima em 522 nm (cor vermelha rubi) confirma a formação das GNPs. De acordo com dados reportados na literatura, GNPs com absorção máxima em 525 nm, indica um tamanho na faixa de 10-25nm. (Zou et al. 2006; Haiss et al. 2007; Ojea-Jimenez et al. 2010; Mohan et al. 2013; Ríos-Corripio et al. 2013). Este resultado pode ser corroborado com as análises de MET (Figura 8). ECD+GNPs apresentaram uma banda de absorção máxima em 524 nm. Como pode ser visto, um pequeno deslocamento na banda de absorção máxima foi observado, sugerindo uma possível ligação do ECD nas GNPs.



**Figura 9.** Análises de espectrofotometria por UV-vís das nanopartículas de ouro (GNPs) e das GNPs + ECD (etilenodicisteína dietil éster).

Para uma melhor compreensão da funcionalização da superfície do GNPs pelos íons citrato e conjugação do ECD nas GNPs, análises de FTIR (Figura 10) foram realizadas. Como pode ser observado na Figura 10, as GNPs apresentaram pico do grupo citrato em 1589  $\text{cm}^{-1}$  (C=O) e 1394  $\text{cm}^{-1}$  (COO<sup>-</sup>), confirmando a formação das GNPs (Zou et al. 2006; Ghosh et al. 2013). ECD puro (Figura 10) apresentou picos em 3190  $\text{cm}^{-1}$ , (N-H, amina), 2950 (CH<sub>3</sub>) e 1460 (CH<sub>2</sub>), 1090 e 1030  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, éster) e 711 (C-S) (Kamiński et al. 2012; Zhang et al. 2019). Análise de FTIR do

ECD+GNPs sugere a ligação entre o ECD e as GNPs com o aparecimento dos picos característico do ECD e GNPs. O desaparecimento do pico amina  $3190\text{ cm}^{-1}$  presente no ECD sugere uma ligação covalente com o ácido carboxílico presente nas GNPs. Para confirmar a interação entre os dois compostos, análises de potencial zeta foram realizadas. GNPs apresentaram um potencial zeta negativo ( $-58 \pm 5\text{mV}$ ) devido a presença de íons citrato na sua superfície (Ghosh et al. 2013; Wang et al. 2016; Mohammad, 2019). Um aumento no potencial zeta foi observado quando o ECD foi ligado às GNPs ( $-40 \pm 3\text{mV}$ ), confirmando a ligação do ECD nas GNPs e a excelente estabilidade das nanopartículas.

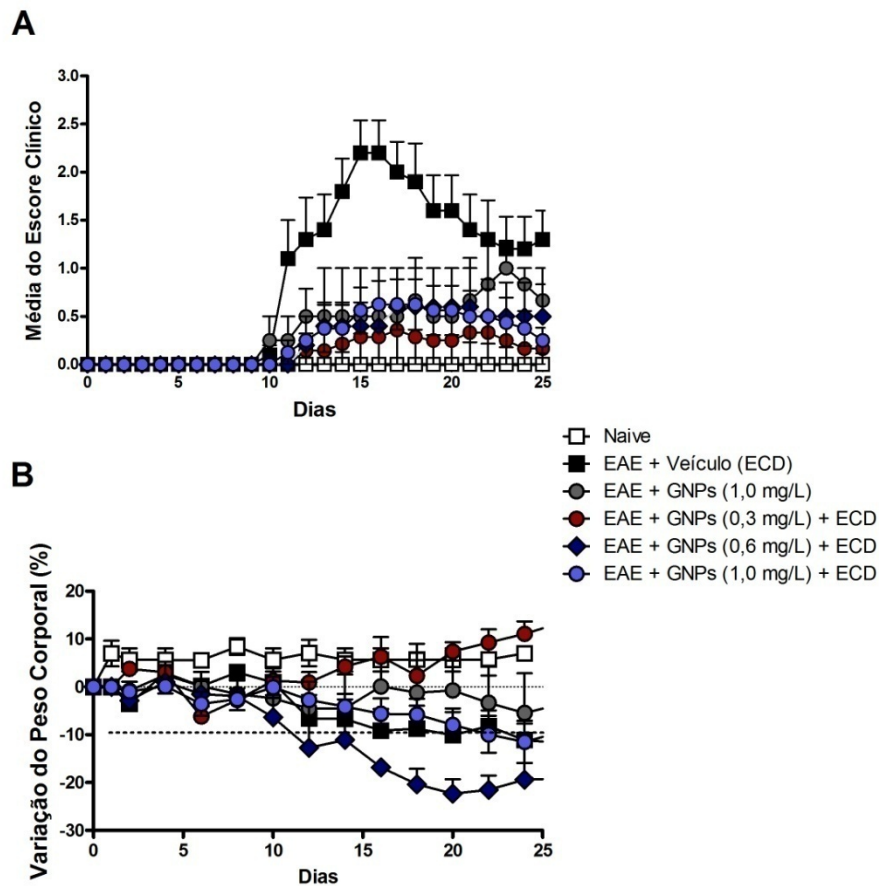


**Figura 10.** Análises por espectroscopia por infravermelho (FTIR) das nanopartículas de ouro (GNPs) e das GNPs + ECD (etilenodisteína dietil éster).

## 4.2 ESTUDO PILOTO

### 4.2.1 Efeito do tratamento com GNPs e ECD sobre os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE

Inicialmente, avaliou-se as manifestações clínicas nos animais com EAE, por meio das análises do escore clínico e o peso dos animais, medidas relacionadas ao desenvolvimento e progressão da doença, conforme descrito previamente (Stromnes e Goverman, 2006). Como pode ser observado na Figura 11A, os animais do grupo EAE + Veículo (ECD) apresentaram paralisia crescente a partir do 10º dia (escore clínico de 0,5) após a indução da EAE e atingiram o escore clínico máximo a partir do 15º dia (escore clínico de 2,5), quando comparados aos animais *naïve*. Por outro lado, os animais tratados com GNPs (1,0mg/L) iniciaram os primeiros sintomas também no 10º dia (escore clínico de 0,5), porém o pico máximo do escore foi no 23º dia, com escore máximo de 1,5. Em contrapartida, os animais tratados com GNPs (0,3, 0,6 e 1,0mg/L) + ECD apresentaram os primeiros sintomas apenas no 11º e 12º dia após a indução da doença (escore clínico de 0,5), e o pico da doença ocorreu no 16º dia (escore clínico de 1,0). Cabe destacar que os animais submetidos ao tratamento com GNPs (1,0mg/L) e GNPs (0,3, 0,6 e 1,0mg/L) + ECD apresentaram uma melhora locomotora quando comparados aos animais que receberam apenas o veículo (ECD) ( $p < 0,05$ ). Além disso, o grupo tratado com GNPs (0,3 mg/L) + ECD apresentou melhor escore clínico quando comparado ao grupo tratado com GNPs (1,0 mg/L) ( $p < 0,05$ ). De acordo com a Figura 11B, pode-se observar que os animais com EAE + Veículo (ECD) apresentaram redução do peso corporal já nos primeiros dias após a indução da EAE, e essa redução acentuou-se nos animais que foram tratados com GNPs (0,6 mg/L) + ECD. Em contraste, os animais que receberam tratamento com GNPs (0,3 mg/L) + ECD ganharam peso quando comparados ao demais grupos experimentais.



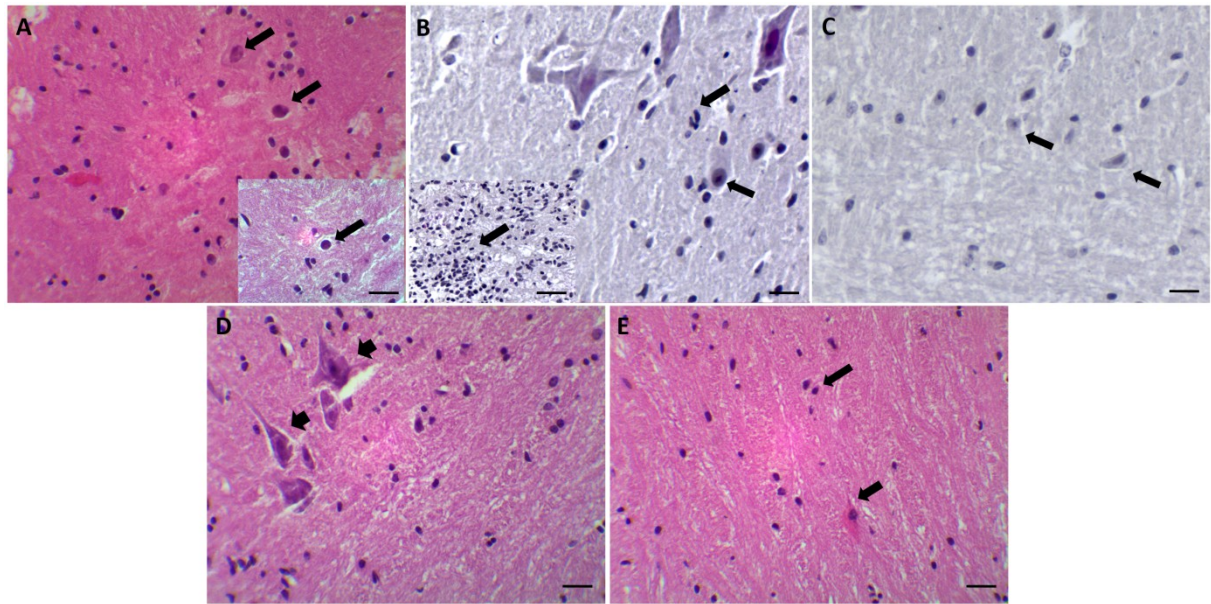
**Figura 11.** Efeito do tratamento das nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodictisteína dietil éster (ECD) no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE). A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. Os animais foram imunizados com a mistura do peptídeo MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *Pertussis*. Escore clínico (A) e variação de peso corporal (B) foram analisados no grupo *naive*, EAE + veículo (ECD), EAE + GNPs (1,0mg/L) e EAE + GNP (0,3, 0,6 e 1,0mg/L), durante 25 dias após a indução da EAE. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### 4.2.2 Tratamento com GNPs e ECD sobre o infiltrado inflamatório no SNC

Com o intuito de confirmar o processo inflamatório na medula espinhal, após indução da EAE, foi realizado a análise histológica da medula espinhal (região lombar). Pode-se observar um aumento do infiltrado inflamatório compatível com lesão neuronal no grupo EAE + veículo (ECD) (Figura 12A). Os grupos EAE tratados com GNP (1,0mg/L) e GNPs (0,3 e 1,0) + ECD apresentam o tecido da medula espinhal compatível com lesão neuronal, com intenso infiltrado de leucócitos e presença de poucos neurônios no tecido (Figuras 12B, 12C e 12E, consecutivamente). De maneira importante, no grupos tratados com GNPs (0,6mg/L)



+ ECD pode-se observar maior presença de neurônios em toda extensão do tecido, o que sugere um aumento da viabilidade neuronal e poucos leucócitos no tecido (Figura 12D).



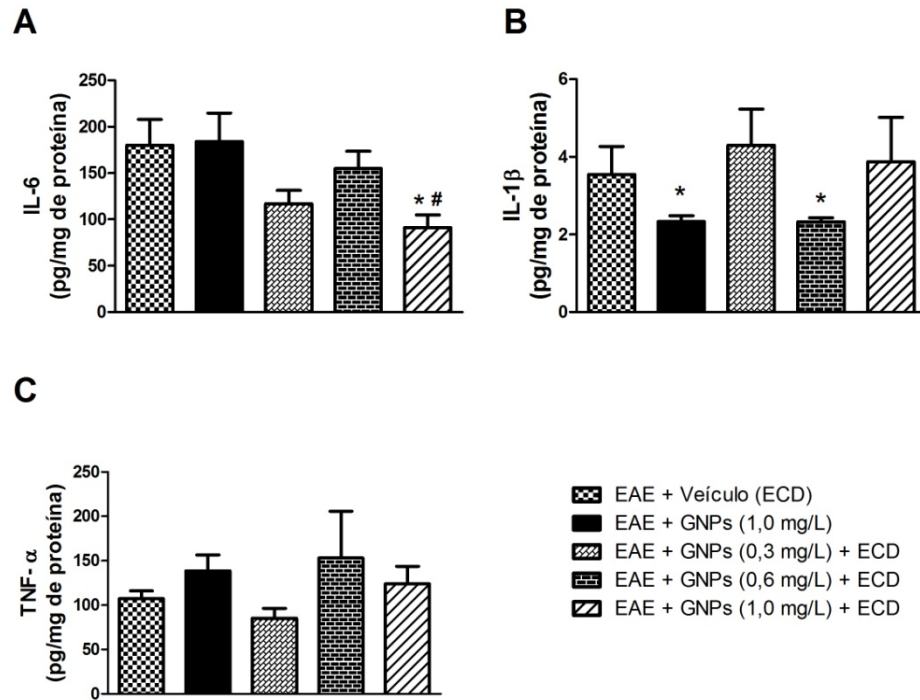
**Figura 12.** Imagens representativas de cortes histológicos transversais de medula espinal corados com coloração de (H&E) de animais submetidos a um protocolo experimental de esclerose múltipla e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) + GNPs em três doses (0,3, 0,6 e 1,0). A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. **A** o grupo EAE apresentou morfologia do tecido nervoso da medula espinal compatível com lesão neuronal, sem a presença de neurônios e com grande infiltrado de leucócitos (setas pretas). No detalhe, em aumento de 100x, observa-se a presença de leucócitos e presença de poucos neurônios no tecido. Na imagem **B**, referente ao grupo EAE + GNPs (1,0mg/L) no tecido nervoso da medula espinal compatível com lesão neuronal, com intenso infiltrado de leucócitos (setas pretas) e presença de poucos neurônios no tecido. No detalhe, em aumento de 40x, imagem com intensa presença de leucócitos. **C** EAE + GNPs (0,3mg/L) + ECD a imagem demonstra expressivo infiltrado de células inflamatórias e poucos neurônios na extensão do tecido. **D** EAE + GNPs (0,6mg/L) + ECD, é possível observar a presença de neurônios fortemente marcados (seta preta) em toda extensão do tecido, sugerindo aumento da viabilidade neuronal e poucos leucócitos no tecido. **E** imagens do grupo EAE + GNP (1,0mg/L) + ECD demonstraram intenso infiltrado de células inflamatórias e poucos neurônios no tecido. **Aquisição das imagens em microscópio óptico: (n=3. Imagens capturadas em objetiva de 40x-aumento de 400x e no detalhe da Figura 12A, objetiva de 100x –aumento de 1000x).**

#### 4.2.3 Efeito do tratamento com GNPs e ECD na produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC, após a indução da EAE

Os resultados demonstraram redução significativa nos níveis de IL-6 na medula espinal dos animais do grupo EAE + GNPs (1,0mg/L) + ECD quando comparados ao grupo EAE + Veículo (ECD) (Figura 13A). Os níveis de IL-1 $\beta$  nos grupos tratados com GNPs (1,0mg/L) e com GNPs (0,6mg/L) + ECD apresentaram

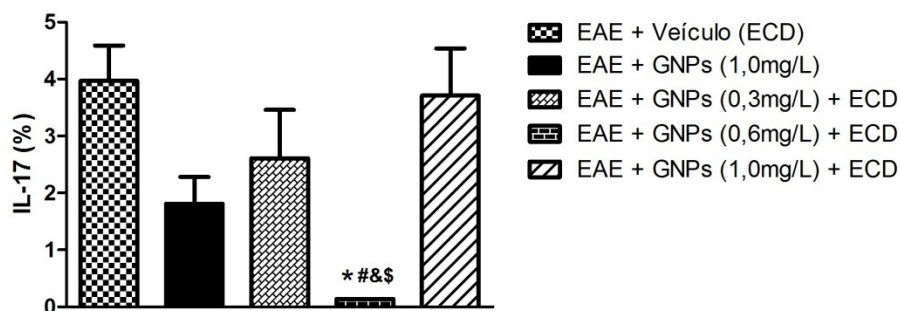


diminuição significativa quando comparados ao grupo EAE + veículo (ECD) (Figura 13B). Quando avaliado os níveis de TNF- $\alpha$  nos grupos, não houve diferença significativa entre os mesmos (Figura 13C).

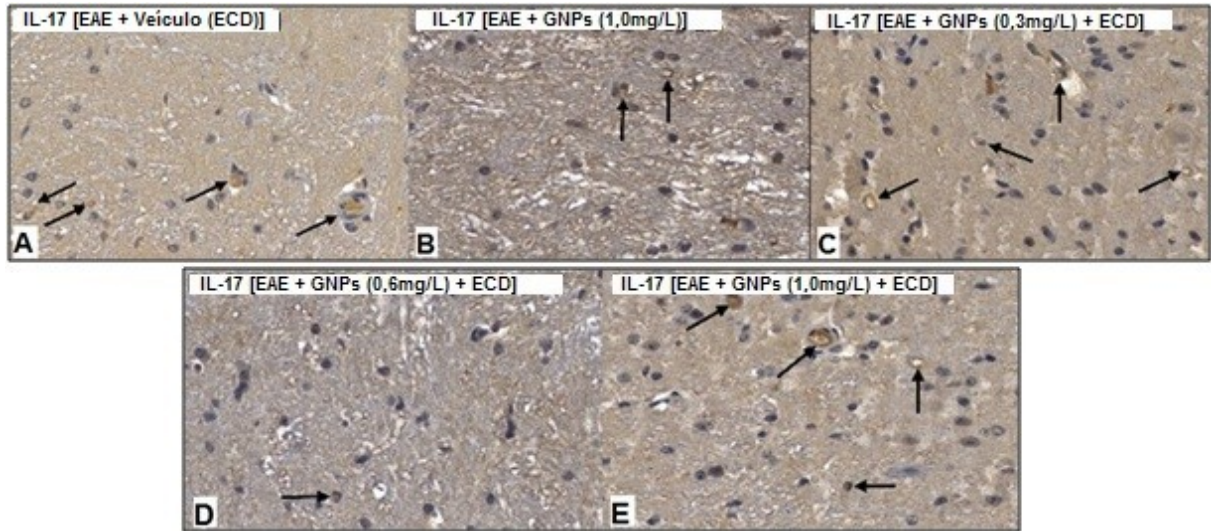


**Figura 13. Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) na produção de citocinas pró-inflamatórias na medula espinhal após a indução da encefalomyelite autoimune experimental (EAE).** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. A medula espinhal foi coletada e processada para avaliar os níveis de IL-6 (A), IL-1 $\beta$  (B) e TNF- $\alpha$  (C) por ELISA. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM, no qual \* $p < 0,05$  versus o grupo EAE + veículo (ECD), # $p < 0,05$  versus o grupo EAE + GNPs (1,0mg/L) (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newmann-Keuls).

A IL-17 foi analisada pela técnica de imuno-histoquímica. Os dados de imunocoloração dessas moléculas são apresentados na Figura 14 e nas imagens representativas da Figura 15. A imunoexpressão de IL-17 foi significativamente reduzida após o tratamento com GNPs 0,6 mg/L + ECD.



**Figura 14. Porcentagem de imunoposição de IL-17 na medula espinhal de animais expostos à encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs) em diferentes concentrações, utilizando o veículo etilenodicisteína dietil éster (ECD).** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. Quinze a vinte imagens foram selecionadas para as áreas de análise e imunopositividade para IL17 e foram expressas como porcentagem média em relação à molécula padrão e analisadas estatisticamente ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados diferentes quando o valor de p foi < 0,05 (\*diferença em relação ao EAE + ECD, # diferença em relação ao EAE + GNPs (1,0mg/L), & diferença em relação ao EAE + GNPs (0,3mg/L) + ECD e \$ diferença em relação ao EAE + GNPs (1,0mg/L) + ECD).

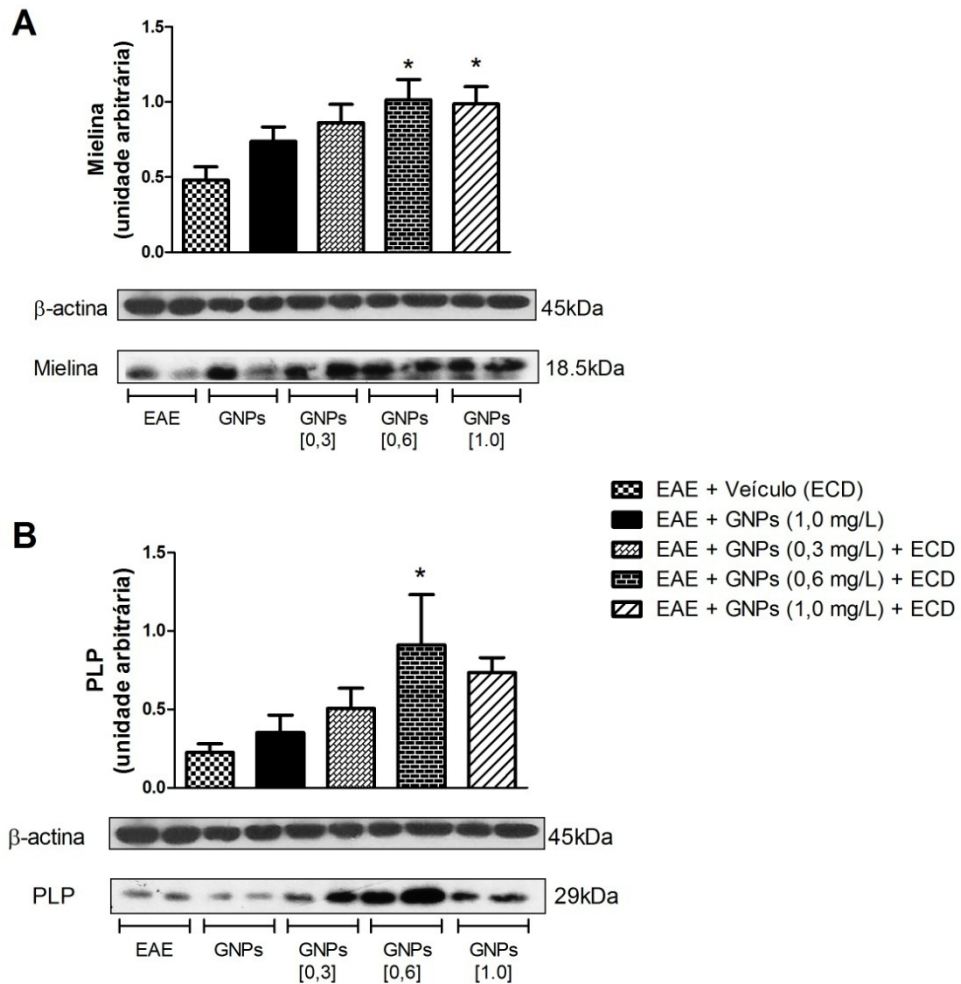


**Figura 15. Imagens representativas da análise imuno-histoquímica da medula espinhal de animais expostos à encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs) em diferentes concentrações, utilizando o veículo etilenodicisteína dietil éster (ECD).** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. Quinze a vinte imagens foram selecionadas para análise na medula espinhal de quatro animais por grupo. As áreas de imunopositividade para IL-17 foram quantificadas (seta preta) e os dados foram analisados estatisticamente usando ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls. (A) EAE + Veículo (ECD), (B) EAE + GNPs (1,0mg/L), (C) EAE + GNPs (0,3mg/L) + ECD, (D) EAE + GNPs (0,6mg/L) + ECD e (E) EAE + GNPs (1,0mg/L) + ECD.

#### 4.2.4 Integridade da bainha de mielina após o tratamento com GNPs e ECD em animais com EAE

A próxima etapa foi avaliar se o tratamento com GNPs, em diferentes doses, e ECD poderia modular o conteúdo da proteína da bainha de mielina durante a resposta autoimune neuroinflamatória induzida pela EAE. Os grupos tratados com GNPs (0,6mg/L) + ECD e GNPs (1,0mg/L) + ECD tiveram aumento do conteúdo de mielina (Figura 16A), e um aumento no conteúdo de PLP no grupo tratado com GNPs (0,6mg/L) + ECD (Figura 16B) quando comparado ao grupo EAE + veículo

(ECD). Estes resultados demonstram que o tratamento com GNPs + ECD (0,6 e 1,0mg/L) mantiveram a integridade da bainha de mielina.



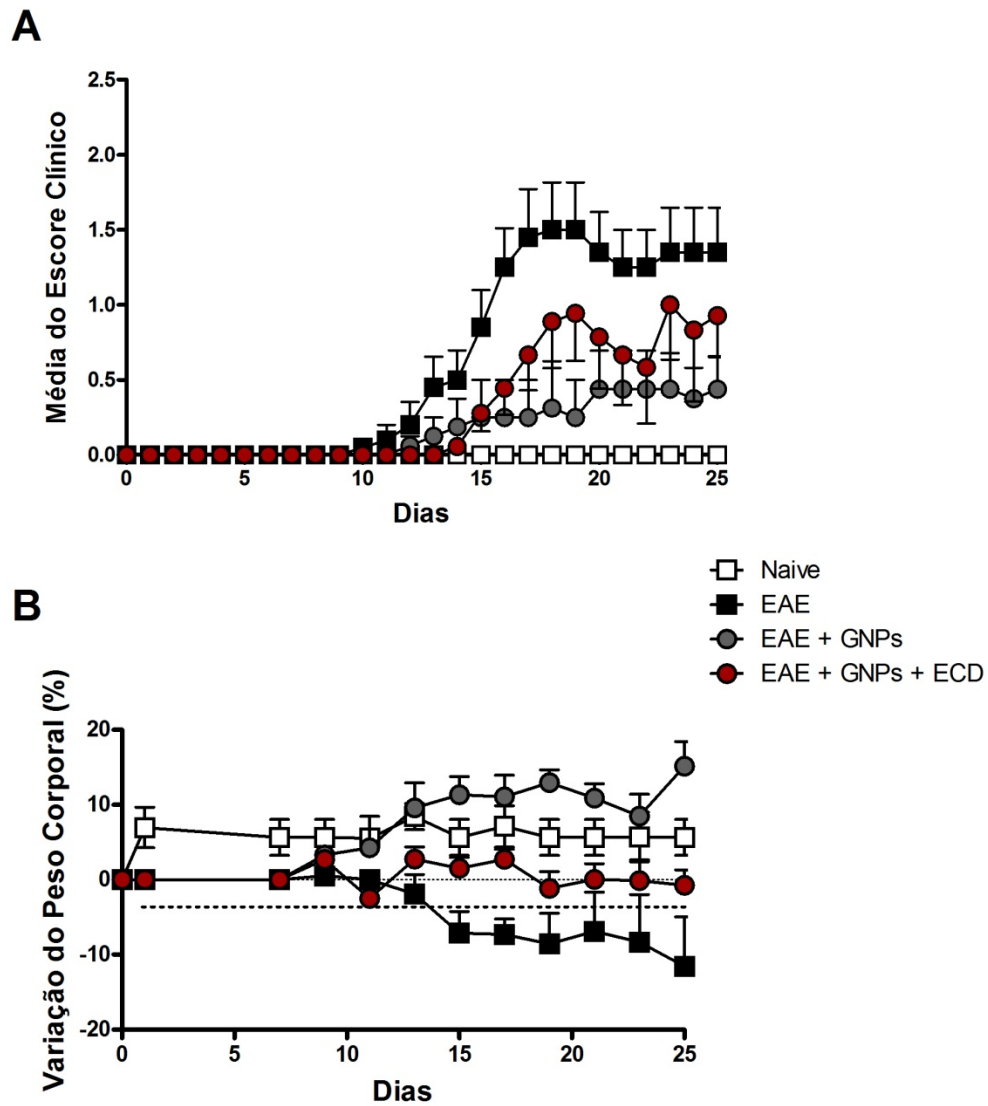
**Figura 16. Danos à bainha de mielina após o tratamento com nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) em animais induzidos a EAE.** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. A expressão da mielina e proteolipoproteína (PLP) foram analisadas na medula espinhal. Os níveis de expressão da mielina (A) e PLP (B) foram determinados por análise de *Western blot*. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM, no qual  $*p < 0,05$  versus o grupo EAE + veículo (ECD) (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newmann-Keuls).

### 4.3 ESTUDO PRINCIPAL

Conforme os resultados do estudo piloto, no qual obteve-se aumento da integridade de mielina e PLP, redução de IL-1 $\beta$  e redução de infiltrado inflamatório na medula espinhal do grupo EAE tratado com GNP 0,6mg/L, foi realizado um novo estudo com esta dosagem de GNPs para a realização de novas análises.

#### 4.3.1 Efeito do tratamento com GNPs e ECD sobre os sinais clínicos e o desenvolvimento da EAE

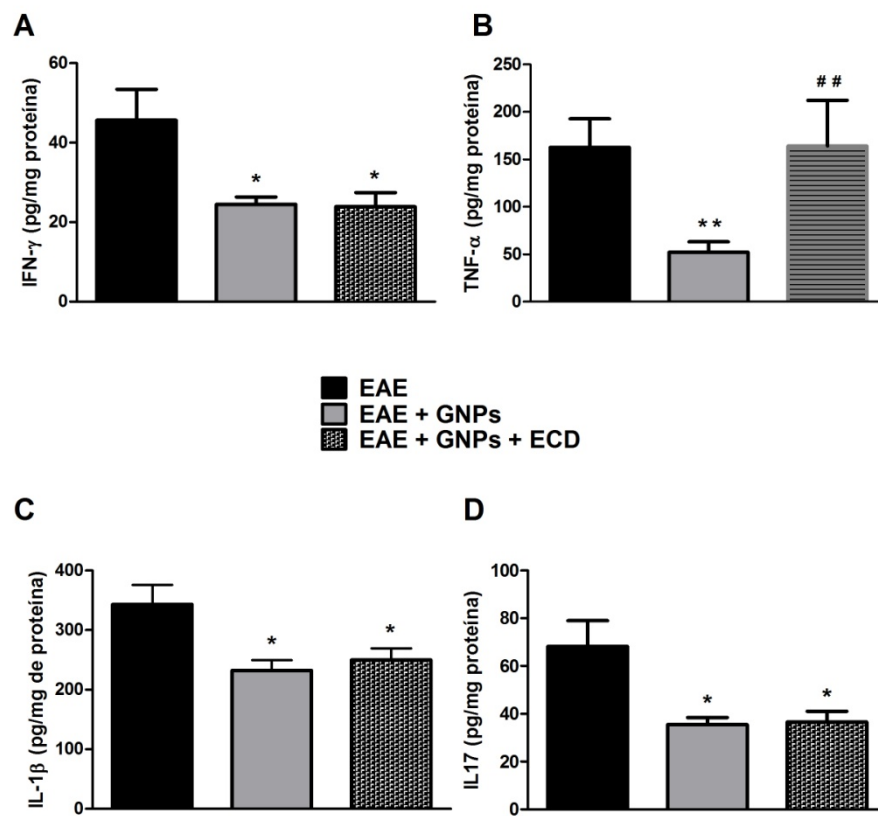
Como pode ser observado na Figura 17A, os animais do grupo EAE apresentaram paralisia crescente a partir do 10º dia (escore clínico de 0,5) após a indução da EAE e atingiram o escore clínico máximo a partir do 17º dia (escore clínico de 2,0), quando comparados aos animais *naïve*. Por outro lado, os animais tratados com GNPs (0,6mg/L) iniciaram os primeiros sintomas também no 12º dia (escore clínico de 0,5), porém o pico máximo do escore foi no 20º dia, com escore máximo de 1,0. Em contrapartida, os animais tratados com GNPs + ECD apresentaram os primeiros sintomas apenas no 14º após a indução da doença (escore clínico de 0,5), e o pico da doença ocorreu no 19º dia (escore clínico de 1,0). É importante mencionar que os animais submetidos ao tratamento com GNPs e GNPs + ECD apresentaram uma melhora locomotora quando comparados aos animais que apresentam a EAE sem tratamento ( $p < 0,05$ ). De acordo com a Figura 17B, pode-se observar que os animais com EAE apresentaram redução do peso corporal já nos primeiros dias após a indução da EAE. Por outro lado, os animais que receberam tratamento com GNPs e GNPs + ECD ganharam peso quando comparado ao grupo EAE.



**Figura 17.** Efeito do tratamento das nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) no desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE). Os animais foram imunizados com a mistura do peptídeo MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *Pertussis*. Escore clínico (A) e variação de peso corporal (B) foram analisados no grupo *naive*, EAE, EAE + GNPs (0,6mg/L) e EAE + GNPs (0,6mg/L) + ECD, durante 25 dias após a indução da EAE. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newmann-Keuls).

#### 4.3.2 Efeito do tratamento com GNPs e ECD na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no SNC, após a indução da EAE

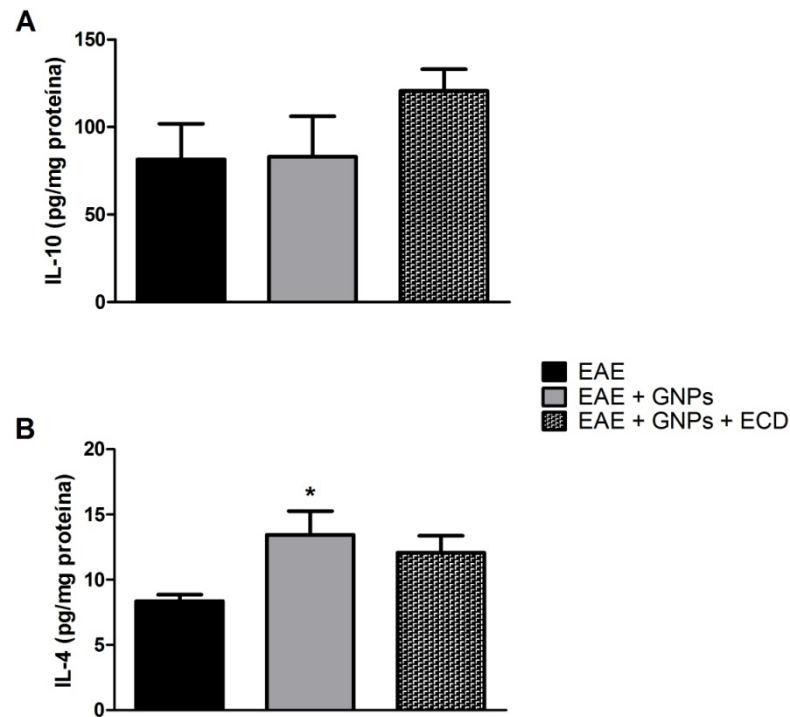
No que diz respeito aos níveis de citocinas pró-inflamatórias, os resultados demonstraram uma redução significativa nos níveis de IFN- $\gamma$  (Figura 18A), TNF- $\alpha$  (Figura 18B), IL-1 $\beta$  (Figura 18C) e IL-17 (Figura 18D) na medula espinhal dos animais dos grupos tratados com GNPs e GNPs + ECD quando comparado ao grupo EAE.



**Figura 18. Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) na produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC após a indução da EAE.** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. A medula espinhal foi coletada e processada para avaliar os níveis de IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) e IL-17 (D) por ELISA no animais EAE e EAE tratados com GNPs (0,6mg/L) e GNPs (0,6mg/L) + ECD. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM, no qual \* $p < 0,05$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newmann-Keuls).

Para a avaliar os níveis de citocinas anti-inflamatórias, foram verificados os níveis de IL-10 e IL-4. Não houve diferença significativa nos níveis de IL-10 entre os grupos (Figura 19A). Em contrapartida, pode-se observar um aumento significativo

nos níveis de IL-4 (Figura 19B) no grupo tratado somente com GNPs quando comparado ao grupo EAE.



**Figura 19. Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicitostéina dietil éster (ECD) na produção de citocinas anti-inflamatórias no SNC após a indução da EAE.** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. A medula espinhal foi coletada e processada para avaliar os níveis de IL-10 (A) e IL-4 (B) por ELISA nos grupos EAE, EAE + GNPs (0,6mg/L) e EAE + GNPs (0,6mg/L) + ECD. Os dados são apresentados como média ± EPM, no qual \*p < 0,05 versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newmann-Keuls).

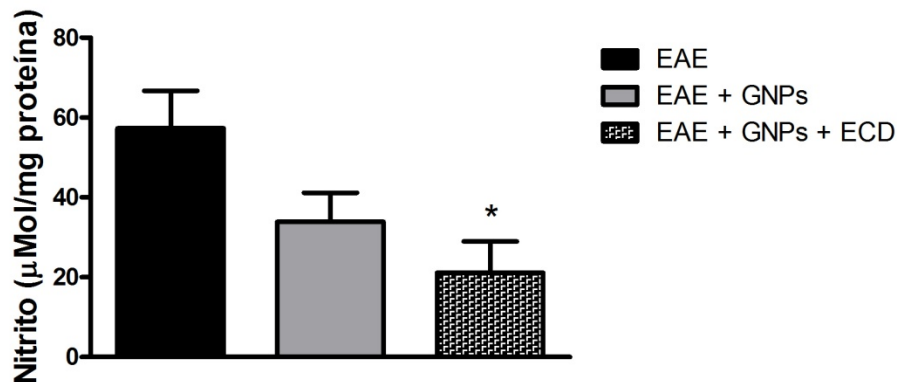
Em conjunto esses resultados sugerem um efeito positivo na modulação da EAE, pelo menos em parte, com a inibição da neuroinflamação induzida pelos linfócitos Th1, Th17 e aumento de IL-4, sem afetar de forma significativa a população de células T regulatórias (IL-10).

#### 4.3.3 Efeito do tratamento com GNPs e ECD na formação de óxido nítrico, após indução da EAE

Como as células imunológicas de indivíduos com EM expressam citocinas inflamatórias e ERO (Larochelle et al., 2011), neste estudo foi analisada a formação de óxido nítrico (ON) nos animais com EAE e naqueles tratados com GNPs e GNPs



+ ECD. Os resultados demonstraram diminuição nos níveis de ON no grupo tratado com GNPs + ECD quando comparado ao grupo EAE (Figura 20).

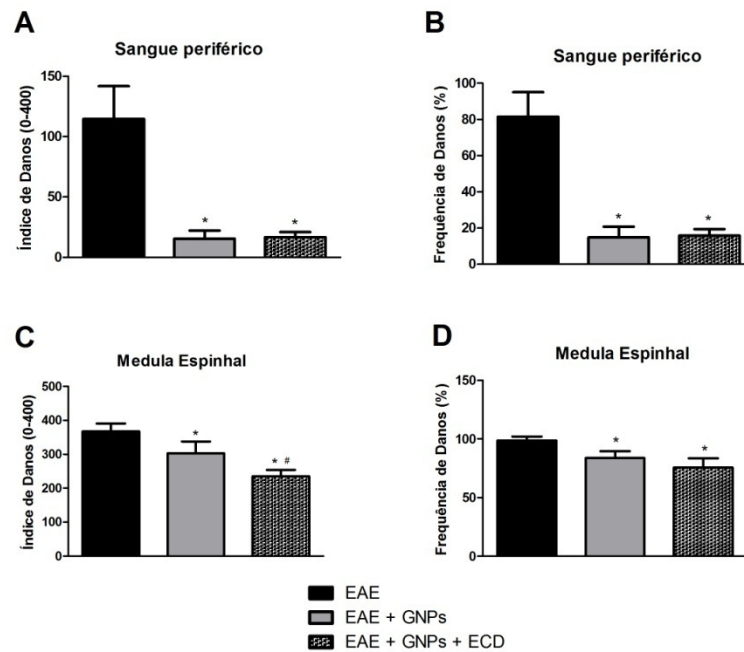


**Figura 20.** Indicador de formação de óxido nítrico no SNC após o tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e GNPs + etilenodicisteína dietil éster (ECD) durante o desenvolvimento da EAE. A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. A formação do óxido nítrico foi analisada no grupo EAE, e nos animais submetidos ao tratamento com GNPs (0,6mg/L) e GNPs (0,6mg/L)+ ECD. Os dados são apresentados como média ± EPM, no qual \* $p < 0,05$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newmann-Keuls).

#### 4.3.4 Efeito do tratamento com GNPs e ECD sobre dano em DNA, após indução da EAE

Na EAE, o efluxo de células autoreativas para o SNC induz a danos no tecido medular (Alvarez et al., 2011). Para confirmar dano em DNA na medula espinhal e no sangue periférico, foi realizado o ensaio cometa. Pode-se observar que houve uma redução significativa do dano em DNA no sangue periférico (Figura 21A e B) e na medula espinhal (Figura 21C e D) nos animais tratados apenas com GNPs e com GNPs + ECD quando comparado ao grupo controle (EAE).

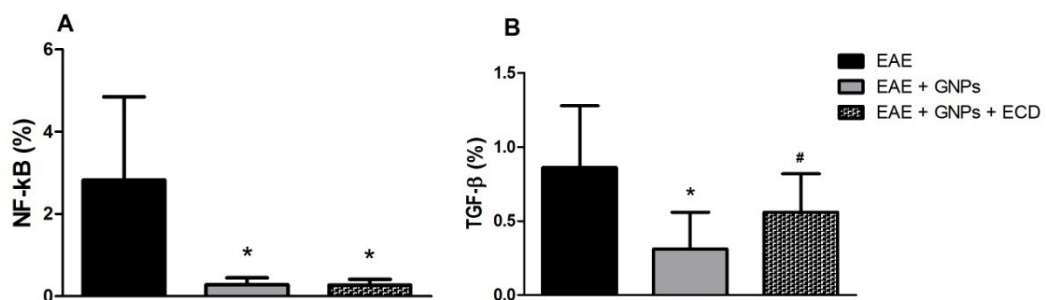




**Figura 21. Efeito do tratamento com nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicitostina dietil éster (ECD) sobre o dano em DNA após indução da EAE.** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. Índice de danos (A) e frequência de danos (B) em DNA no sangue periférico. E índice de danos (C) e frequência de danos (D) na medula espinhal dos grupos EAE, EAE + GNPs (0,6mg/L) e EAE + GNPs (0,6mg/L) + ECD. Os dados são apresentados como média ± EPM, no qual \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  versus o grupo EAE, # $p < 0,05$  versus o grupo EAE + GNP (0,6 mg/L) (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Tukey).

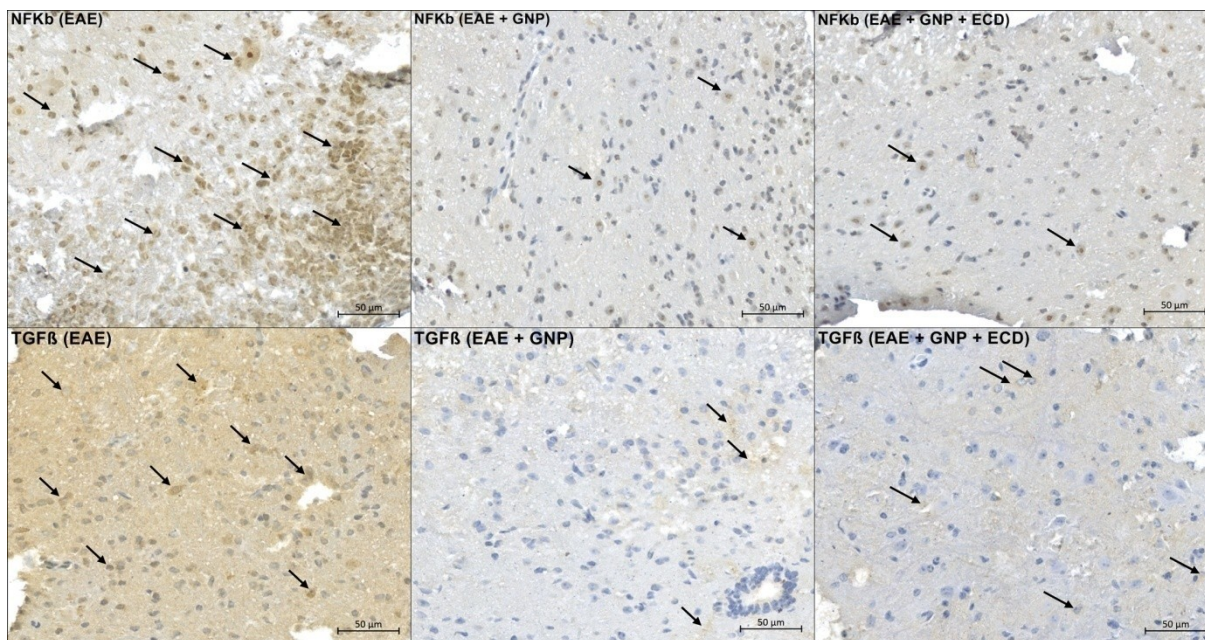
#### 4.3.5 Análise imuno-histoquímica de NF- $\kappa$ B e TGF- $\beta$ no tratamento com GNPs e ECD após indução da EAE

A marcação de NF- $\kappa$ B e TGF- $\beta$  foram analisadas como marcadores da função inflamatória. Os dados de imunocoloração dessas moléculas são apresentados na Figura 22A e 22B e nas imagens representativas na Figura 23. A imunoexpressão de NF- $\kappa$ B e TGF- $\beta$  foi significativamente reduzida após o tratamento com GNPs e GNPs + ECD.



**Figura 22. Porcentagem média de imunoexpressão de NF- $\kappa$ B e TGF- $\beta$  na medula espinhal de animais expostos a encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com nanopartículas de**

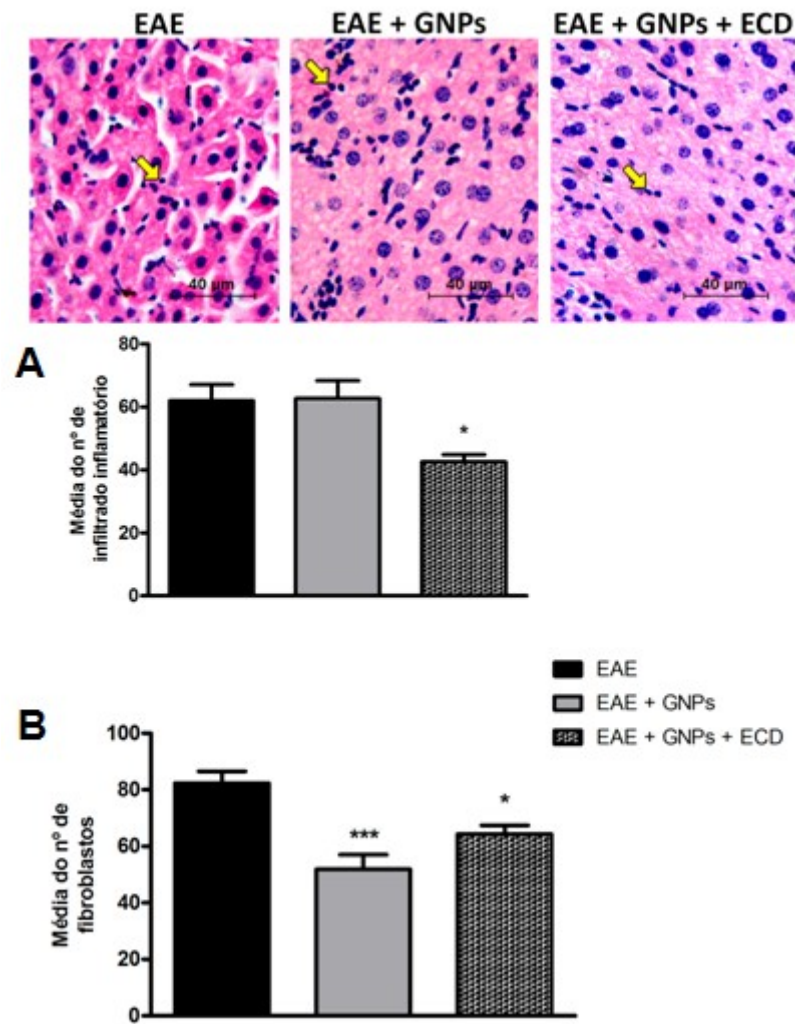
**ouro (GNPs) e etileno dicisteinodietiléster (ECD) como veículo.** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. Quinze a vinte imagens foram selecionadas para as áreas de análise e imunopositividade para NF-kB e TGF- $\beta$  foram expressos como porcentagem média em relação à molécula padrão e analisados estatisticamente usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls. Os grupos foram considerados diferentes quando o valor de p foi < 0,05 (\* diferença em relação ao EAE, # diferença em relação ao EAE + GNPs).



**Figura 23.** Imagens representativas da análise imuno-histoquímica da medula espinhal de animais expostos à encefalite autoimune experimental (EAE) e tratados com nanopartículas de ouro (GNPs). A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. Quinze a vinte imagens foram selecionadas para as áreas de análise e imunopositividade para NF-kB e TGF- $\beta$  nos grupos EAE, EAE + GNPs (0,6mg/L) e EAE + GNPs (0,6mg/L) + ECD, e foram expressos como porcentagem média em relação à molécula padrão. As imagens foram quantificadas (seta preta), e os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Newman-Keuls.

#### 4.3.6 Avaliação da toxicidade no fígado do tratamento com GNPs e ECD, após a indução da EAE

A segurança do tratamento foi avaliada por análise histológica do fígado como mostra a Figura 24. A análise histológica do fígado, mostrou que o grupo tratado com GNPs + ECD obteve uma redução do infiltrado inflamatório no fígado (Figura 24A) quando comparado ao grupo EAE. Além disso, quando analisado o número de fibroblastos pode-se observar uma redução significativa nos grupos tratados com GNPs e GNPs + ECD (Figura 24B). Com estes resultados pode-se confirmar que o tratamento com as GNPs e GNPs + ECD não foi tóxico ao fígado.



**Figura 24. Efeito do tratamento de nanopartículas de ouro (GNPs) e etilenodicisteína dietil éster (ECD) no fígado, após a indução da EAE.** A EAE foi induzida com MOG<sub>35-55</sub>/CFA e toxina *pertussis*. Análise histológica do fígado nos animais com EAE e nos animais EAE tratados com GNPs (0,6mg/L) e GNPs (0,6mg/L) + ECD. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM, no qual \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  versus o grupo EAE (ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Newmann-Keuls).

## 5 DISCUSSÃO

As GNPs têm sido usadas no tratamento de diversas doenças devido as suas propriedades anti-inflamatórias. A maioria das nanopartículas costumam se acumular no sistema de fagócitos mononucleares (MPS), como fígado, baço, linfonodos e medula óssea (Wilhelm et al., 2016; Xiong et al., 2018), e apenas menos 0,7% de nanopartículas podem ser entregues nos locais de ação desejados (Wilhelm et al., 2016; Tavares et al., 2017) e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica torna-se limitada. Com base nesses achados, esta pesquisa teve como objetivo avaliar se o ECD poderia entregar as GNPs diretamente ao SNC e reduzir a neuroinflamação de maneira mais eficiente.

Nesta pesquisa, foi analisado diferentes concentrações de GNPs ligadas ao ECD no tratamento de um modelo experimental de EM. Já está estabelecido na literatura que a EM, assim como a EAE, é caracterizada pela ativação de células mononucleares, principalmente, células TCD4+ e TCD8+ (McFarland e Martin, 2007; Goverman, 2009). Os linfócitos T autorreativos, tais como Th1 e Th17, expressam diferentes citocinas inflamatórias, além de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as enzimas que facilitam a migração de leucócitos para o SNC (Larochelle et al., 2011), o que causam a neuroinflamação, desmielinização e degeneração axonal (McFarland e Martin, 2007; Dasgupta et al., 2013). Sabe-se que as GNPs são utilizadas em diversos tratamentos devido à excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade e imunogenicidade (Aziz et al., 2012), e estabilidade (Rosi e Mirkin, 2005), além de apresentar propriedades medicinais anti-inflamatórias e antioxidantes (Barathmanikanth et al., 2010; Silveira et al., 2016; de Carvalho et al., 2018). Em adição, o ECD atravessa a BHE íntegra por difusão passiva em razão direta ao fluxo sanguíneo cerebral (Vallabhajosula et al., 1989; Tanaka et al., 2000; Inoue et al., 2001), e é utilizado como carreador de radionuclídeos para fins de identificação de processos fisiológicos em organismos vivos e terapia (Carlson, 1995). Neste contexto, não há relatos na literatura da utilização do ECD como carreador de medicamentos para o SNC no tratamento de doenças, neste trabalho o ECD foi utilizado para viabilizar as GNPs para o SNC.

Primeiramente foram analisadas as propriedades físico-química das GNPs e possíveis interações físico-química com o ECD, pode-se observar que as GNPs

apresentaram um tamanho na faixa de 10-20 nm e morfologia esférica, e a incorporação do ECD nas GNPs não alterou o tamanho e a morfologia das GNPs. Sabe-se que a toxicidade é dependente de diversos fatores, tais como tamanho, concentração, método de injeção, metabolismo, excreção e resposta imune (Li et al., 2018). O uso *in vivo* de GNPs de 10 nm revestida com citrato nos animais com EAE não causou toxicidade no fígado, como confirmado pela literatura (Chen et al., 2013). Com esses achados, pode-se observar que as GNPs ligadas ao ECD podem contribuir com a redução da neuroinflamação na EM.

A neuroinflamação e desmielinização são responsáveis pelos sintomas clínicos, formas clínicas, incapacidade e progressão da EM (Sospedra et al., 2016). Os sintomas clínicos típicos da doença envolvem a deficiência física, cognitiva e sensorial (Hafler, 2004; Kawakami et al., 2005; Goverman, 2009; Costanza et al., 2012; Dutra et al., 2013a; Dutra et al., 2013b). O modelo experimental de EM segue curso clínico previsível caracterizado por período prodrômico de 10 a 15 dias, onde a paralisia se manifesta inicialmente na cauda e patas traseiras progredindo para os membros anteriores, concomitante a perda de peso (Levy et al., 2010). Como esperado, os resultados deste trabalho demonstraram déficit locomotor nos animais com EAE, corroborando com os dados previamente descritos por Levy et al. (2010) e por Souza et al. (2017). Todavia, quando os animais foram submetidos ao tratamento com GNPs e GNPs ligadas ao ECD houve diminuição significativa desses déficits. Conforme um estudo realizado por Nosratabadi et al. (2016), sobre a eficácia anti-inflamatória e imunomodulatória *in vivo* e *in vitro* da hiperforina (Hyp) em combinação com o GNPs, os ratos tratados com Hyp-GNP exibiram escores clínicos reduzidos e atrasaram o início da doença. Segundo Aghaie et al., (2019), a gravidade dos sintomas da EM diminuiu significativamente nos grupos tratados com GNPs e polietilenoglicol (PEG). Assim, o tratamento de GNPs e GNPs + ECD pode ter reduzido a desmielinização no SNC.

Na EAE os sinais clínicos surgem quando as células imunes encefalitogênicas adentram no SNC, e a progressão da EAE está associada à produção e atividade de citocinas pró-inflamatórias (Moudgil et al., 2011; Engelhardt e Ransohoff, 2012; Kuerten et al., 2013). As células Th1 e Th17 têm a capacidade de orquestrar o influxo de células inflamatórias nas lesões do SNC através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (Lovett-Racke et al., 2011; Ge et al., 2013; Nosratabadi et al., 2016). Em contrapartida, citocinas anti-inflamatórias podem ter



efeitos protetores contra a progressão da doença em animais com EAE (Venkatesha et al., 2014; Azizi et al., 2012; Xing et al., 2019; Esmailzadeh et al., 2019). Logo, sabe-se que a redução da neuroinflamação melhora a função motora na EM, consequentemente, melhora a qualidade de vida de indivíduos com EM.

Assim, para compreender os principais mecanismos bioquímicos envolvidos na EM e que podem ser modulados pela GNP e GNP + ECD, foram realizadas análises sobre os parâmetros de citocinas pró e anti-inflamatórias no SNC de camundongos fêmeas C57BL/6. Os níveis elevados de IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-1 $\beta$  e TGF- $\beta$  na EAE estão correlacionados com a exacerbação da doença (Larochelle et al., 2011; Ge et al., 2013; Souza et al., 2017). A maioria dos mediadores inflamatórios, tais como IL-1 $\beta$ , IL-17, e IFN- $\gamma$  são produzidos por leucócitos durante a transmigração, os quais podem afetar a integridade da BHE (Weiss et al., 2009; Alvarez et al., 2011). Estudos demonstram que o tratamento com GNP reduziu significativamente os níveis de TGF- $\beta$ 1 (Kim et al., 2015; Al-Trad et al., 2019). Sumbayev et al. (2013) mostrou que GNP estabilizadas com citrato regulam negativamente as respostas celulares induzidas pela IL-1 $\beta$  e neutralizam a função desta citocina. Experiências *in vivo* também realizadas em vários modelos animais de condições inflamatórias confirmaram as propriedades anti-inflamatórias das GNP, manifestadas por uma diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e marcadores de danos oxidativos nos tecidos (de Araújo et al. 2017; Sumbayev et al. 2013). Um estudo realizado por Park et al., (2019) mostrou que as GNP com o extrato de *Ephedra sinica* Stapf podem diminuir os níveis de citocinas e mediadores pro-neuroinflamatórios, o que resulta na melhoria de distúrbios neurodegenerativos, através da desregulação das vias de sinalização IKK- $\alpha/\beta$ , NF- $\kappa$ B, JAK/STAT, ERK-1/2, p38 MAPK e JNK na microglia estimulada por LPS, mas aumentaram a expressão de heme oxigenase-1 (HO-1) e NAD(P)H:quinona oxidoreductase (NQO1) e ativação de fator nuclear E2 (Nrf2) e AMPK, consequentemente, redução da expressão de iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Em outro estudo, sobre o efeito das GNP, Tsai et al. (2007) demonstraram que a administração intra-articular de GNP em um modelo murino com artrite reumatóide, reduziu a angiogênese, a infiltração de macrófagos reduziu as citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), além de melhorar o curso clínico da doença. Sendo que, a produção reduzida de citocinas inflamatórias (INF- $\gamma$  e IL-1 $\beta$ ) pelos GNP resultou da

supressão do NF- $\kappa$ B, o principal fator de transcrição responsável por produção de citocinas sob condições patológicas (Norton et al. 2008; Khan e Khan, 2018).

Em suma, estudos demonstram que as GNPs podem atuar como anti-inflamatório, através de mecanismos como: as GNPs fazem ligação direta com IL1- $\beta$  e inibem sua ligação com seu receptor; e inibem a sinalização de NF- $\kappa$ B (fator nuclear- $\kappa$ B) via bloqueio da fosforilação da I $\kappa$ B quinase e evita a translocação de NF- $\kappa$ B para o núcleo, consequentemente, evita a transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Muller et al., 2017; Silveira et al, 2016, Lai et al., 2016). Com intuito de investigar a regulação da resposta imunitária das GNPs e GNPs + ECD, foi analisado a resposta da NF- $\kappa$ B. Os resultados demonstram que houve uma redução significativa dos níveis de NF- $\kappa$ B na medula espinhal dos animais com EAE tratados com GNP. Conforme Crisan et al. (2018) as GNPs associadas a extratos ricos em polifenóis parecem reprimir a ativação de NF- $\kappa$ B em macrófagos, inibindo a produção de fatores pró-inflamatórios com papel causal na psoríase. Assim como, Khan e Khan et al. (2018) confirmam que as GNPs reduzem significativamente o nível de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , COX-2 e fator de transcrição NF- $\kappa$ B, atenuando notavelmente o desequilíbrio entre antioxidante e oxidante próximo ao normal, além de regular positivamente a expressão de mRNA de NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , COX-2 e iNOS. As GNPs inibem a expressão das moléculas de adesão celular (CAM) induzida por TNF- $\alpha$ , afetando duas vias distintas, tais como: regulação transcricional por interferência nas vias de sinalização relacionadas a NF- $\kappa$ B, e a degradação da proteína CAM, através do aumento da ubiquitinação (Lai et al., 2016). A migração de citocinas inflamatórias para SNC causa aumento da degradação da bainha de mielina e morte neuronal.

Os linfócitos T e suas citocinas não apenas podem induzir a danos, mas também podem exibir funções restauradoras na homeostase do SNC (Ellwardt et al., 2016). Segundo Walsh et al., (2015) as células T auxiliares 2 (TH2) produtoras de IL-4 exercem efeitos benéficos sobre os neurônios após lesão no SNC. O tratamento intratecal de IL-4 na EAE reverteu a progressão da doença em um estudo realizado por Vogelaar et al. (2018). Em adição, conforme Koutouros et al. (2014), a depleção aguda de células T reguladoras (Treg) exacerba a gravidade da EAE, acompanhada por aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e proliferação de células T efetoras. Assim, as células Treg medeiam a recuperação da EAE controlando a produção de citocinas, a proliferação e a motilidade das células T efetoras no SNC.

Em um estudo realizado por Dos Santos Tramontin et al. (2019), a IL-4 foi aumentada no córtex em animais com doença de Alzheimer tratados com GNPs. Em outro estudo, Liu et al. (2013), demonstraram que as GNPs foram eficazes no tratamento de isquemia/reperfusão (I/R) no modelo animal de acidente vascular encefálico (AVE), verificou-se que a administração de GNPs melhorou os déficits neurológicos, aumentaram a produção de citocinas anti-inflamatórias, bem como inibiram a ativação induzida por I/R em astrócitos e microglias, estes resultados sugerem que as GNPs aumentam a neuroproteção devido ao seu efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico. De fato, os resultados deste estudo demonstraram uma redução significativa de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17 e TGF- $\beta$  nos animais com EAE tratados com GNPs 0,6mg/ml e GNPs 0,6mg/ml + ECD e um aumento significativo de IL-4 no animais que receberam tratamento apenas com GNPs 0,6mg/L. Neste contexto, podemos afirmar que um aumento de citocinas anti-inflamatórias poderá auxiliar na redução da neuroinflamação e, consequentemente, maior viabilidade neuronal.

O SNC é susceptível a danos induzidos por ERO, devido a uma maior exigência de oxigênio no cérebro e baixa concentração de enzimas antioxidantes (Miller et al., 2013; Penta et al., 2013). A ERO são derivados principalmente de macrófagos/microglia ativados (Lee et al., 2012) e estão associados à patogênese da desmielinização inflamatória, assim como na maioria das doenças neurodegenerativas (Witherick et al., 2011; Dasgupta et al., 2013). A ativação de monócitos e macrófagos, assim como microglia, produzem diferentes mediadores inflamatórios, incluindo ON e ERO, os quais contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença (Fischer et al., 2012; Kovacic e Somanathan, 2012; Lee et al., 2012, Souza et al., 2017). A óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é conhecida também como sendo um dos principais contribuintes para a iniciação/exacerbação de doenças inflamatórias/degenerativas do SNC através da produção excessiva de ON e, consequente, produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN), as quais tem sido implicadas nos danos à bainha de mielina e oligodendrócitos no modelo de EAE (Christensen et al., 2013; Miller et al., 2013; Yang et al., 2013, Souza et al., 2017).

Os oligodendrócitos e a mielina são altamente sensíveis ao ON, o que provoca a desregulação da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, em associação com a produção de peroxinitrito (Penta et al., 2013). A regulação da



iNOS mediada por NF- $\kappa$ B é um fenômeno importante da resposta inflamatória (Aktan et al., 2003). Alguns trabalhos demonstraram o efeito anti-inflamatório das GNPs, consistindo na inibição de EROs e nitrito, além de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos (Kurniawan et al. 2017; Zhang et al. 2011). As GNPs mostraram reduzir a produção de ON, IL-6 e TNF- $\alpha$  pelos macrófagos, estes resultados sugeriram que as GNPs atenuaram a produção de ON, diminuindo a expressão da iNOS (Zhu et al., 2018). Devido a sua grande área de superfície com carga positiva nas há interação entre os elétrons desemparelhados dos radicais livres com os prótons presentes da superfície das GNPs (Barathmanikanth, 2010; Chen, 2013; Silveira, 2014). Como confirmado por Gul et al. (2018), as GNPs regularam negativamente os níveis de ON e expressão de NF- $\kappa$ B e iNOS na artrite reumatóide.

Neste contexto, nossos achados confirmam a redução significativa do ON na medula espinhal dos animais com EAE tratados com GNP + ECD, sendo que o ECD pode ter tido efeito positivo no carreamento das GNPs de forma direta para o SNC.

A disfunção mitocondrial tem sido implicada na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas, como a EM (Keogh e Chinnery, 2015; Ryan et al. 2015; Patergnani et al., 2017). Através de métodos bioquímicos, como oxidação de nucleotídeos, proteínas e lipídeos, estudos demonstram que o dano na bainha de mielina pode ser induzido por ERO em pacientes com EM (Van Horssen et al., 2011; Grecchi et al., 2012; Lee et al., 2012). Segundo Tang e colaboradores (2019), um dos fatores que contribuem no processo de desmielinização na EM é a acetilação da histona e a metilação do DNA, no qual os níveis de DNA 5-hidroximetilcitosina (5hmc) na medula espinhal diminuiu significativamente na EM. Conforme Madsen et al. (2017) o dano ao DNA mitocondrial (mtDNA) pode causar oligodendropatia primária que, por sua vez, desencadeia desmielinização. Corroborando com esses dados, os resultados aqui descritos, demonstraram que os animais submetidos ao tratamento com GNPs + ECD, diminuíram significativamente os níveis de ON, e consequentemente, reduziram os danos em DNA.

Sabe-se que na EAE ocorre neuroinflamação e destruição da bainha de mielina (McFarland e Martin, 2007; Dasgupta et al., 2013, Souza et al, 2017), caracterizadas por infiltração de células imunes, tais como linfócitos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas no espaço perivascular (Alvarez et al., 2011). Após verificar os benefícios das GNPs e GNPs + ECD sobre o processo inflamatório no SNC, foi analisado a integridade da mielina. Pode-se observar que os animais

tratados com GNPs (0,6mg/L) + ECD aumentaram significativamente os níveis de mielina no SNC, corroborando com a análise histológica da medula espinhal, os resultados mostraram uma redução de infiltrado inflamatório e maior presença de neurônios. Estes resultados confirmam os benefícios da GNPs no SNC, como descrito no estudo realizado por Aghaie et al. (2019), no qual mostraram que o número e a gravidade das células infiltradas e lesões desmielinizantes diminuíram significativamente na medula espinhal de animais com EAE tratados com GNPs + polietilenoglicol (PEG). Assim, este estudo demonstra que as GNPs podem ter reduzido infiltrado inflamatório no SNC e, conseqüentemente, redução do dano à bainha de mielina e melhora da integridade neuronal.

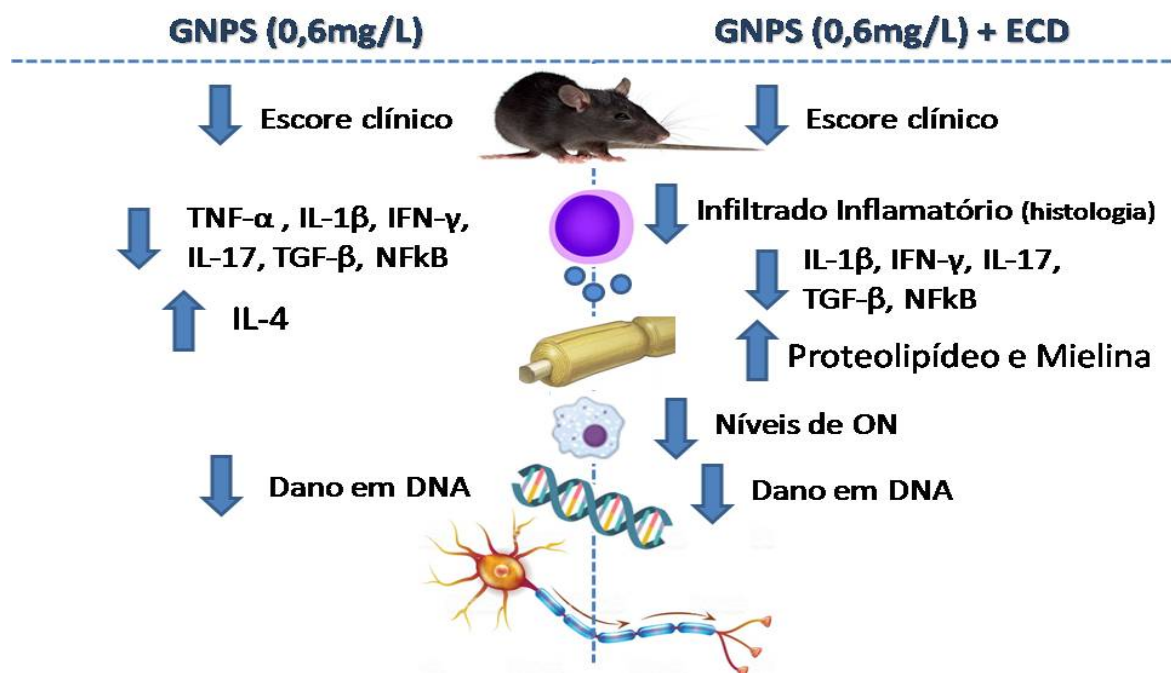
Durante o curso da EAE, os linfócitos TCD4+ autorreativos são ativados e migram para o SNC, após atravessarem a BHE (Huang et al., 2011), onde a cascata inflamatória conduz à neuroinflamação, desmielinização e lesão axonal (Wang et al., 2012). Experiências *in vivo* também realizadas em vários modelos animais de condições inflamatórias confirmaram as propriedades anti-inflamatórias das GNPs manifestadas pela diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (de Araújo et al. 2017; Tsai et al. 2012; Dohnert et al. 2012; Sumbayev et al. 2013). Estudos mostraram que o tratamento com GNPs apresentam propriedades anti-inflamatórias (Tsai et al., 2007; Barathmanikanth et al., 2010; Silveira et al., 2016; de Carvalho et al., 2018). Nanopartículas, incluindo ouro, prata e óxido de ferro, aumentam a diferenciação neuronal, a sobrevivência e o crescimento neuronal. Foi relatado que o ouro causa a estimulação elétrica e o aumento da diferenciação celular das células PC-12, bem como o aumento da excitabilidade elétrica das células neuronais (Polak et al., 2015). Conforme Aghaie et al. (2019) as GNPs diminuíram a infiltração linfocítica e uma diminuição na desmielinização no SNC.

Assim, os resultados deste estudo demonstraram que as GNPs e GNPs + ECD apresentaram melhora nos sinais clínicos da doença. Foi verificado uma redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), infiltrado inflamatório, redução de óxido nítrico e redução de dano em DNA, adicionalmente uma redução de TGF- $\beta$ , além de uma aumento da integridade da bainha de mielina nos animais EAE tratados com GNPs (0,6mg/L) + ECD. Além disso, o tratamento somente com as GNPs (0,6 mg/L) obteve resultado positivo, como redução de IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , aumento de IL-4, redução de NF- $\kappa$  $\beta$  e TGF- $\beta$ , redução do dano em DNA, e aumento da integridade da mielina. Neste

contexto, acredita-se que os animais com EAE tratados com GNPs e GNPs + ECD apresentaram um aumento da mielina, preservação de neurônios, devido a redução de infiltrado inflamatório, de citocinas pro-inflamatórias e de óxido nítrico na medula espinhal, o que pode ser confirmado com a melhora dos sinais clínicos característicos da EAE.

## 6 CONCLUSÃO

Os achados demonstram que o tratamento com GNPs e GNPs + ECD, atenuou os sinais neurológicos da EAE, provavelmente por inibição da neuroinflamação induzidos pela EAE, como mostra a Figura 25. Esses resultados também sugerem que o tratamento com GNPs e GNPs (0,6mg/L) + ECD mantiveram a integridade da bainha de mielina, inibição da produção de óxido nítrico e dano em DNA no modelo animal de EM. Sendo que, o ECD quando associado as GNPs obteve resultados satisfatórios em algumas análises, como redução de infiltrado inflamatório, redução da IL-17, integridade da bainha de mielina, aumento de IL-4, e pode ser considerado como um adjuvante na entrega de medicamentos para o SNC. Por fim, os resultados do presente estudo nos permitem concluir que o tratamento com GNPs e GNPs + ECD, pode representar uma alternativa farmacológica no tratamento das doenças imunomediadas, tal como a EM. Todavia, mais estudos experimentais sobre os benefícios das GNPs e o impacto do ECD na entrega de fármaco são necessários.



**Figura 25. Ilustração esquemática sobre os resultados de GNPs (0,6mg/L) e GNPs (0,6mg/L) + ECD no tratamento da EAE.** Pode-se observar que tanto as GNPs (0,6mg/L) quanto as GNPs (0,6mg/L) + ECD obtiveram resultados positivos na melhora do escore clínico, redução de citocinas pró-inflamatórias, redução dos níveis de óxido nítrico e dano em DNA na medula espinhal, além de melhorar a integridade da bainha de mielina.

## REFERÊNCIAS

- ABEM. Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (BR). Atlas da EM 2013. Mapeamento da Esclerose Múltipla no Mundo. São Paulo, 2013.
- [Aghaie T](#), [Jazayeri MH](#), [Avan A](#), [Anissian A](#), [Salari AA](#). Gold nanoparticles and polyethylene glycol alleviate clinical symptoms and alter cytokine secretion in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *IUBMB Life*. 2019;71(9):1313-1321.
- Aktan F, Henness S, Roufogalis BD, Ammit AJ. Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF- $\kappa$ B-mediated iNOS protein expression. *Nitric Oxide*. 2003;8(4):235-42.
- Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):252-64.
- Al-Trad B, Aljabali A, Al-Zoubi M, Shehab M, Omari S. Effect of gold nanoparticles treatment on the testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:3145-3154..
- Arora P, Sharma S, Garg S. Permeability issues in nasal drug delivery. *Drug Discov Today*. 2002 Sep 15;7(18):967-75.
- Asharani PV, Hande MP, Valiyaveetil S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biol*. 2009;10:65.
- Aziz MS, Suwanpayak N, Jalil MA, Jomtarak R, Saktioto T, Ali J, Yupapin PP. Gold nanoparticle trapping and delivery for therapeutic applications. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:11-7.
- Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012;34(6):881-95.
- Baranzini SE, Mudge J, van Velkinburgh JC, Khankhanian P, Khrebtukova I, Miller NA, Zhang L, Farmer AD, Bell CJ, Kim RW, May GD, Woodward JE, Caillier SJ, McElroy JP, Gomez R, et al. Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature*. 2010; 464(7293):1351-6.
- Barathmanikanth S, Kalishwaralal K, Sriram M, Pandian SR, Youn HS, Eom S, Gurunathan S. Anti-oxidant effect of gold nanoparticles restrains hyperglycemic conditions in diabetic mice. *J Nanobiotechnology*. 2010; 8:16.
- Batcheller L, Baker D. Cost of disease modifying therapies for multiple sclerosis: Is front-loading the answer? *J Neurol Sci*. 2019;404:19-28.
- Bjartmar C, Trapp BD. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: Mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol*. 2001; 14(3):271-8.

Becher B, Prat A, Antel JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*. 2000;29(4):293-304.

Bénardais K, Pul R, Singh V, Skripuletz T, Lee DH, Linker RA, Gudi V, Stangel M. Effects of fumaric acid esters on blood-brain barrier tight junction proteins. *Neurosci Lett*. 2013; 555:165-70.

Benveniste EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1998; 9:259-75.

Boroujerdi A, Welser-Alves JV, Milner R. Extensive vascular remodeling in the spinal cord of pre-symptomatic experimental autoimmune encephalomyelitis mice; increased vessel expression of fibronectin and the  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. *Exp Neurol*. 2013; 250:43-51.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.

Breckwoldt MO, Gradl J, Hähnel S, Hielscher T, Wildemann B, Diem R, Platten M, Wick W, Heiland S, Bendszus M. Increasing the sensitivity of MRI for the detection of multiple sclerosis lesions by long axial coverage of the spinal cord: a prospective study in 119 patients. *J Neurol*. 2017;264(2):341-349.

Brieger K, Schiavone S, Miller Jr FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012; 142:w13659.

Broccolo F, Fusetti L, Ceccherini-Nelli L. Possible role of human herpesvirus 6 as a trigger of autoimmune disease. *Scientific World Journal*. 2013; 2013:867389.

Carlson S. A glance at the history of nuclear medicine. *Acta Oncol*. 1995;34(8):1095-102.

[Castro-Borrero](#) W, Graves D, Frohman TC, Flores AB, Hardeman P, Logan D, Orchard M, Greenberg B, Frohman EM. Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review. *Ther Adv Neurol Dis*. 2012; 5(4): 205-20.

Cattelotte J, Tournier N, Rizzo-Padoin N, Schinkel AH, Scherrmann JM, Cisternino S. Changes in dipole membrane potential at the mouse blood-brain barrier enhance the transport of 99mTechnetium Sestamibi more than inhibiting Abcb1, Abcc1, or Abcg2. *J Neurochem*. 2009;108(3):767-75.

Campbell GR, Ziabreval, Reeve AK, Krishnan KJ, Reynolds R, Howell O, Lassmann H, Turnbull DM, Mahad DJ. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2011; 69(3):481-92.

Chae SY, Lee M, Kim SW, Bae YH. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials*. 2004; 25(5): 843-50.

Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol*. 2013;4:63.

Chen YS, Hung YC, Liao I, Huang GS. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 2009;4(8):858-864.

Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare DJ, Cortie MB, Valenzuela SM. In vivo study of spherical gold nanoparticles: inflammatory effects and distribution in mice. *PLoS One*. 2013; 8(2):e58208.

Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslová K, Vaughan N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30(2):139-46.

Costanza M, Colombo MP, Pedotti R. Mast cells in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(11):15107-25.

Christensen JR, Börnsen L, Khademi M, Olsson T, Jensen PE, Sørensen PS, Sellebjerg F. CSF inflammation and axonal damage are increased and correlate in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013; 19(7):877-84.

Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. RORγ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunol*. 2011;12(6):560-567.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-31.

Correale J, Abad P, Alvarenga R, et al. Manejo de la esclerosis múltiple recurrente-remitente en Latinoamérica: recomendaciones prácticas para la optimización del tratamiento. *J Neurol Sci*. 2014;339:196-206.

Crisan D, Scharffetter-Kochanek K, Crisan M, Schatz S, Hainzl A, Olenic L, Filip A, Schneider LA, Sindrilaru A. Topical silver and gold nanoparticles complexed with Cornus mas suppress inflammation in human psoriasis plaques by inhibiting NF-κB activity. *Exp Dermatol*. 2018;27(10):1166-1169.

Dalgas U, Stenager E. Exercise and disease progression in multiple sclerosis: can exercise slow down the progression of multiple sclerosis? *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5(2):81-95.

Dasgupta A, Zheng J, Perrone-Bizzozero NI, Bizzozero OA. Increased carbonylation, protein aggregation and apoptosis in the spinal cord of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *ASN Neuro*. 2013; 5(1):e00111.

de Araújo RF Júnior, de Araújo AA, Pessoa JB, Freire Neto FP, da Silva GR, Leitão Oliveira AL, de Carvalho TG, Silva HF, Eugênio M, Sant'Anna C, Gasparotto LH.

Anti-Inflammatory, Analgesic and anti-Tumor properties of gold nanoparticles. *Pharmacol Rep.* 2017;69(1):119-129.

de Carvalho TG, Garcia VB, de Araújo AA, da Silva Gasparotto LH, Silva H, Guerra GCB, de Castro Miguel E, de Carvalho Leitão RF, da Silva Costa DV, Cruz LJ, Chan AB, de Araújo Júnior RF. Spherical neutral gold nanoparticles improve anti-inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in alcohol-methamphetamine-induced liver injury in rats. *Int J Pharm.* 2018;548(1):1-14.

de Jong, W. H., Borm, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine.* 2008; 3(2):133-149.

de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, 't Hart BA, Laman JD. Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 2002; 169(10):5415-23.

Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049.

Dohnert MB, Venâncio M, Possato JC, Zeferino RC, Dohnert LH, Zugno AI, De Souza CT, Paula MM, Luciano TF. Gold Nanoparticles and Diclofenac Diethylammonium Administered by Iontophoresis Reduce Inflammatory Cytokines Expression in Achilles Tendinitis. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:1651-7.

Dohnert MB, Ferreira GK, [Silveira](#) PC, Zanoni ET, Dohnert LH, de Souza CT, Paula MM. Inflammatory cytokines content in Achilles tendinopathy after phonophoresis treatment combined with gold nanoparticles and diclophenac diethylammonium in rats. 2015;38(3):1044-9.

[dos Santos Tramontin](#) N, da Silva S, Arruda R, Ugioni KS, Canteiro PB, de Bem Silveira G, Mendes C, Silveira PCL, Muller AP. Gold Nanoparticles Treatment Reverses Brain Damage in Alzheimer's Disease Model. *Mol Neurobiol.* 2019;1-11.

Dutra RC, Bento AF, Leite DF, Manjavachi MN, Marcon R, Bicca MA, Pesquero JB, Calixto JB. The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes. *Neurobiol Dis.* 2013a; 54:82-93.

Dutra RC, Moreira EL, Alberti TB, Marcon R, Prediger RD, Calixto JB. Spatial reference memory deficits precede motor dysfunction in an experimental autoimmune encephalomyelitis model: the role of kallikrein-kinin system. *Brain Behav Immun.* 2013b; 33:90-101.

Ellwardt E, Walsh JT, Kipnis J, Zipp F. Understanding the Role of T Cells in CNS Homeostasis. *Trends Immunol.* 2016;37(2):154-165.

Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* 2012; 33(12):579-89.



Esmailzadeh E, Soleimani M, Zare-Abdollahi D, Jameie B, Khorram Khorshid HR. Curcumin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in a C57BL/6 mouse model. *Drug Dev Res*. 2019;80(5):629-636.

Evans C, Beland SG, Kulaga S, Wolfson C, Kingwell E, Marriott J, Koch M, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 2013;40(3):195-210.

GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. 2019;18(5):459-480.

Ge Z, Da Y, Xue Z, Zhang K, Zhuang H, Peng M, Li Y, Li W, Simard A, Hao J, Yao Z, Zhang R. Vorinostat, A histone deacetylase inhibitor, suppresses dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol*. 2013; 241:56-66.

Fang M, Sun Y, Hu Z, Yang J, Davies H, Wang B, Ling S, Han S. C16 peptide shown to prevent leukocyte infiltration and alleviate detrimental inflammation in acute allergic encephalomyelitis model. *Neuropharmacology*. 2013; 70:83-99.

Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, Mahad D, Bradl M, van Horssen J, Lassmann H. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*. 2012;135(Pt3):886-99.

Ghosh R, Deka J, Chattopadhyay A, Paul A. Conformation aspect in the  $\alpha$ -amylase induced agglomeration of citrate-stabilized gold nanoparticles. *RSC Adv*. 2013; 3:23015–23027.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol*. 2004; 251(3):261-8.

[Glass](#) CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 2010;140(6):918-34.

Goldstein A, Soroka Y, Frusic-Zlotkin M, Lewis A, Kohen R. The bright side of plasmonic gold nanoparticles; activation of Nrf2, the cellular protective pathway. *Nanoscale*. 2016;8(22):11748-59.

Gordon K J and Blobe G C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease *Biochim. Biophys. Acta*. 2008;1782:197-228

Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(6):393-407.

Grecchi S, Mazzini G, Lisa A, Armentero MT, Bergamaschi R, Romani A, Blandini F, Di Perri C, Scovassi AI. Search for Cellular Stress Biomarkers in Lymphocytes from Patients with Multiple Sclerosis: A Pilot Study. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44935.

Gromnicova R, Davies HA, Sreekanthreddy P, Romero IA, Lund T, Roitt IM, Phillips JB, Male DK. Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro. *PloS One*. 2013; 8(12), e81043.

Gul A, Kunwar B, Mazhar M, Faizi S, Ahmed D, Shah MR, Simjee SU. Rutin and rutin-conjugated gold nanoparticles ameliorate collagen-induced arthritis in rats through inhibition of NF- $\kappa$ B and iNOS activation. *International Immunopharmacology*. 2018; 59:310-317.

Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2004;113(6):788-94.

[Haider](#) L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2011;134(Pt7):1914-24.

Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Supporting Information: Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem*. 2007;79:4215–4221.

Harvey J, Clark G, Osborne C, Allred D. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1474-81.

He Y, Du M, Gao Y, Liu H, Wang H, Wu X, Wang Z. Astragaloside IV attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis of mice by counteracting oxidative stress at multiple levels. *PLoS One*. 2013; 8(10):e76495.

Hedstrom AK, Sundqvist E, Baarnhielm M, Nordin N, Hillert J, Kockum I, et al. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain*. 2011;134(Pt 3):653-664.

Huang XN, Fu J, Wang WZ. The effects of fasudil on the permeability of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier following experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2011; 239(1-2):61-7.

Inoue Y, Abe O, Kawakami T, Ozaki T, Inoue M, Yokoyama I, Ohtomo K. Metabolism of <sup>99m</sup>Tc-ethylcysteinate dimer in infarcted brain tissue of rats. *Journal of Nuclear Medicine*. 2001;42(5):802-807.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2; Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;47(7359):6:214-219.

[Jeon KI](#), [Byun MS](#), [Jue DM](#). Gold compound auranofin inhibits IkappaB kinase (IKK) by modifying Cys-179 of IKKbeta subunit. *Exp Mol Med*. 2003 Apr 30;35(2):61-6.

Kabat, EA, Glusman, M, Knaub, V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med*. 1948; 4(5):653-62.

Kabat EA, Freedman DA, Murray JP, Knaub V. A study of the crystalline albumin, gamma globulin and the total protein in the cerebrospinal fluid of one hundred cases of multiple sclerosis and other diseases. *Am J Med Sci*. 1950; 219(1):55-64

Kamiński M, Kudelski A, Pecul M. Vibrational optical activity of cysteine in aqueous solution: A comparison of theoretical and experimental spectra. *J Phys Chem B*. 2012;116:4976–4990.

Kanwar JR, Sun X, Punj V, Sriramoju B, Mohan RR, Zhou SF, Chauhan A, Kanwar RK. Nanoparticles in the treatment and diagnosis of neurological disorders: Untamed dragon with fire power to heal. *Nanomedicine*. 2012;8(4):399-414.

[KaragkouniA](#), AlevizosM, Theoharides TC. Effect of stress on brain inflammation and multiple sclerosis. *AutoimmunRev*. 2013;12(10):947-53.

Kawakami N, Odoardi F, Ziemssen [I](#), Bradl M, Ritter [I](#), Neuhaus O, Lassmann H, Wekerle H, Flügel A. Autoimmune CD4+ T cell memory: lifelong persistence of encephalitogenic T cell clones in healthy immune repertoires. *J Immunol*. 2005; 175(1):69-81.

Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, Zaheer S, Iyer SS, Zaheer A. Neuroinflammation induces neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine*. 2016;1(1). pii: 1003.

Keogh MJ, Chinnery PF. Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1847(11):1401-11.

Khalaj AJ, Yoon J, Nakai J, Winchester Z, Moore SM, Yoo T, Martinez-Torres L, Kumar S, Itoh N, Tiwari-Woodruff SK. Estrogen receptor (ER)  $\beta$  expression in oligodendrocytes is required for attenuation of clinical disease by an ER $\beta$  ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(47):19125-30.

[Khan MA](#), [Khan MJ](#). Nano-gold displayed anti-inflammatory property via NF-kB pathways by suppressing COX-2 activity. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup1):1149-1158.

Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: A review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews*. 2011;40(3),1647-71.

Kim JE, Lee J, Jang M, Kwak MH, Go J, Kho EK, Hwang DY. Accelerated healing of cutaneous wounds using phytochemically stabilized gold nanoparticle deposited hydrocolloid membranes. *Biomaterials Science*. 2015.3(3):509-19.

Klaren RE, Motl RW, Woods JA, Miller SD. Effects of exercise in experimental autoimmune encephalomyelitis (an animal model of multiple sclerosis). *J Neuroimmunol.* 2014; 274(1-2):14-19.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.

Koutrolos M, Berer K, Kawakami N, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:163.

Kovacic P, Somanathan R. Redox processes in neurodegenerative disease involving reactive oxygen species. *Curr Neuropharmacol.* 2012;10(4):289-302.

Kuerten S, Wunsch M, Lehmann PV. Longitudinal T cell-derived IFN- $\gamma$ /IL-17 balances do not correlate with the disease course in two mouse models of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol Methods.* 2013; 398-399:68-75

Kurniawan A, Gunawan F, Nugraha AT, Ismadji S, Wang MJ. Biocompatibility and Drug Release Behavior of Curcumin Conjugated Gold Nanoparticles from Aminosilane-Functionalized Electrospun poly(N-Vinyl-2-Pyrrolidone) Fibers. *Int J Pharm.* 2017;516(1-2):158-169.

Ladeira F, Braz L, Salgado P, Vaz S, Leitão L, Félix C, Correia AS, Silva AMD, Salgado V, Ferreira F, Vale J, Sá MJ, Capela C. A multicenter, non-interventional study to evaluate the disease activity in Multiple Sclerosis after withdrawal of Natalizumab in Portugal. *Clin Neurol Neurosurg.* 2019;184:105390.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.

Lai TH, Shieh JM, Tsou CJ, Wu WB. Gold nanoparticles induce heme oxygenase-1 expression through Nrf2 activation and Bach1 export in human vascular endothelial cells. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:5925–5939.

Lai TH, Chung CH, Chen BH, Hung CF, Inbaraj BS, Ma MC, Chen HM, Tsou CJ, Wu PH, Wu WB. Gold Nanoparticles Compromise TNF- $\alpha$ -Induced Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Through NF- $\kappa$ B and Protein Degradation Pathways and Reduce Neointima Formation in a Rat Carotid Balloon Injury Model. *J Biomed Nanotechnol.* 2016;12(12):2185-01.

Larochelle C, Alvarez JI, Prat A. How do immune cells overcome the blood–brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.* 2011; 585(23):3770-80.

Lee DH, Gold R, Linker RA. Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Modulation via Fumaric Acid Esters. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(9):11783-803.

Levy H, Assaf Y, Frenkel D. Characterization of brain lesions in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *Exp Neurol*. 2010; 226(1):148-58.

Li X, Hu Z, Ma J, Wang X, Zhang Y, Wang W, Yuan Z. The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of goldnanoparticles. *Coll Surf Bio*. 2018;167:260-6.

Ling J, Kumar R. Crosstalk between NFkB and glucocorticoid signaling: a potential target of breast cancer therapy. *Cancer Lett*. 2012; 322:119-126.

Liu Z, Shen Y, Wu Y, Yang Y, Wu J, Zhou P, Lu X, Guo Z. An intrinsic therapy of gold nanoparticles in focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9(6):1017-28.

Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):246-51.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National multiple sclerosis society (USA) advisory committee on clinical trials of new agents in multiple sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-11.

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.

Machado S. et al. *Recomendações esclerose múltipla*. São Paulo: Omnifarma, 2012. 112 p.

Madsen PM, Pinto M, Patel S, McCarthy S, Gao H, Taherian M, Karmally S, Pereira CV, Dvorianchikova G, Ivanov D, Tanaka KF, Moraes CT, Brambilla R. Mitochondrial DNA Double-Strand Breaks in Oligodendrocytes Cause Demyelination, Axonal Injury, and CNS Inflammation. *J Neurosci*. 2017;37(42):10185-10199.

Male D, Gromnicova R, McQuaid C. Gold Nanoparticles for Imaging and Drug Transport to the CNS. *Int Rev Neurobiol*. 2016;130:155-98.

Mangalam A, Poisson L, Nemutlu E, Datta I, Denic A, Dzeja P, Rodriguez M, Rattan R, Giri S. Profile of circulatory metabolites in a relapsing-remitting animal model of multiple sclerosis using global metabolomics. *J Clin Cell Immunol*. 2013; 30(4):1-25.

McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007; 8(9):913-9.

Miller E, Walczak A, Majsterek I, Kędziora J. Melatonin reduces oxidative stress in the erythrocytes of multiple sclerosis patients with secondary progressive clinical course. *J Neuroimmunol*. 2013; 257(1-2):97-101.

Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888-898.

Mizuno T, Zhang G, Takeuchi H, Kawanokuchi J, Wang J, Sonobe Y, et al. Interferon-gamma directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor. *FASEB J*. 2008;22(6):1797-1806.

Mohammad I. Gold nanoparticle: An efficient carrier for MCP I of Carica papaya seeds extract as an innovative male contraceptive in albino rats. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019;52:942-56.

Mohan JC, Praveen G, Chennazhi KP, Jayakumar R, Nair S V. Functionalised gold nanoparticles for selective induction of in vitro apoptosis among human cancer cell lines. *J Exp Nanosci*. 2013; 8:32–45.

[Moore](#) FG, Wolfson C. Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2002; 106(2):63-83.

Moudgil KD, Choubey D. Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interf Cytokine Res*. 2011;31(10):695-703.

Motl RW, Arnett PA, Smith MM, Barwick FH, Ahlstrom B, Stover EJ. Worsening of symptoms is associated with lower physical activity levels in individuals with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008;14(1):140-2.

Motl RW, Sandroff BM, Benedict RH. Cognitive dysfunction and multiple sclerosis: developing a rationale for considering the efficacy of exercise training. *Mult Scler*. 2011a; 17(9):1034-40.

Muller AP, Ferreira GK, Pires AJ, de Bem Silveira G, de Souza DL, Brandolfi JA, de Souza CT, Paula MMS, Silveira PCL. Gold nanoparticles prevent cognitive deficits, oxidative stress and inflammation in a rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017. 1;77:476-483.

Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(12), 933–944.

Neher JJ, Neniskyte U, Zhao JW, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J Immunol*. 2011;186(8):4973-83.

Norton S. A brief history of potable gold. *Mol Interv*. 2008 Jun;8(3):120-3.

Nosratabadi R, Rastin M, Sankian M, Haghmorad D, Mahmoudi M. Hyperforin-loaded gold nanoparticle alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing Th1 and Th17 cells and upregulating regulatory T cells. *Nanomedicine*. 2016;12(7):1961-1971.



Ohl K, Tenbrock K, Kipp M. Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp. Neurol.* 2016; 277:58-67.

Ojea-Jimenez I, Romero FM, Bastuss NG, Puentes V. Small gold nanoparticles synthesized with sodium citrate and heavy water: Insights into the reaction mechanism. *J Phys Chem C.* 2010; 114:1800-04.

Oliveira SR, Kallaur AP, Simão AN, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, Petenucci DL, da Silva E, Cecchini R, Kaimen-Maciel DR, Reiche EM. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci.* 2012; 321(1-2):49-53.

Park SY, Yi EH, Kim Y, Park G. Anti-neuroinflammatory effects of *Ephedra sinica* *Stapf* extract-capped gold nanoparticles in microglia. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:2861-2877.

Patergnani S, Fossati V, Bonora M, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Rusielewicz T, Wieckowski MR, 707 Pinton P. Mitochondria in Multiple Sclerosis: Molecular Mechanisms of Pathogenesis. *Int 708 Rev Cell Mol Biol.* 2017; 328:49-103.

Paula MM, Petronilho F, Vuolo F, Ferreira GK, De Costa L, Santos GP, Effting PS, Dal-Pizzol F, Dal-Bó AG, Frizon TE, Silveira PC, Pinho RA. Gold nanoparticles and/or N-acetylcysteine mediate carrageenan-induced inflammation and oxidative stress in a concentration-dependent manner. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(10):3323-30.

Penta A, Moreno B, Reix S, Fernandez-Diez B, Villanueva M, Errea O, Escala N, Vandenbroeck K, Comella JX, Villoslada P. Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines Contribute to Demyelination and Axonal Damage in a Cerebellar Culture Model of Neuroinflammation. *PLoS One.* 2013; 8(2):e5472

Pereira R, Dias L, Ávila J, Santos N, Gurgel EL, Cherchiglia ML, Acúrcio F, Reis A, Meira W, Guerra AF. Unified Health Database Creation: 125 Million Brazilian Cohort from Information Systems of Hospital, Outpatient, Births, Notifications and Mortalities. *International Journal of Population Data Science.* 2017;1:205.

Pfeiffer F, Schäfer J, Lyck R, Makrides V, Brunner S, Schaeren-Wiemers N, Deutsch U, Engelhardt B. Claudin-1-induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 2011;122(5):601-14.

Polak P, Shefi O. Nanometric agents in the service of neuroscience: manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles. *Nanomed. Nanotechnol. Biol Med* 2015; 11:1467-79.

Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Pedras-Vasconcelos J, Verthelyi D, Dittel BN. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;178(1):39-48.

Racke MK. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). *Current Protocols in Neuroscience*. 2001; 9(9.7):1-9.

Ramirez-Ramirez V, Macias-Islas MA, Ortiz GG, Pacheco-Moises F, Torres-Sanchez ED, Sorto-Gomez TE, Cruz-Ramos JA, Orozco-Aviña G, Celis de la Rosa AJ. Efficacy of fish oil on serum of TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , and IL-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013:709493.

Ríos-Corripio MA, García-Pérez BE, Jaramillo-Flores ME, Gayou VL, Rojas-López M. UV-Visible intensity ratio (aggregates/single particles) as a measure to obtain stability of gold nanoparticles conjugated with protein A. *J Nanoparticle Res*. 2013;15:1624.

Rosi NL, Mirkin CA. Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev* 614 2005;105(4):1547-62.

Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in 728 Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*. 2015; 40:200-210.

Sela H, Cohen H, Elia P, Zach R, Karpas Z, Zeiri Y. Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *Journal of Nanobiotechnology*. 2015;13(1), 71.

Seven A, Aslan M, Incir S, Altıntaş A. Evaluation of oxidative and nitrosative stress in relapsing remitting multiple sclerosis: effect of corticosteroid therapy. *Folia Neuropathol*. 2013; 51(1):58-64.

Sethi A, Kulkarni N, Sonar S, Lal G. Role of miRNAs in CD4 T cell plasticity during inflammation and tolerance. *Front Genet*. 2013;4:8.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *ExpCell Res*. 1988;175(1):184-91.

[Sriram](#) S, Stratton CW, Yao S, Tharp A, Ding L, Bannan JD, Mitchell WM. Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1999; 46(1):6-14.

Souza PS, Gonçalves ED, Pedroso GS, Farias HR, Junqueira SC, Marcon R, Tuon T, Cola M, Silveira PCL, Santo AR, Calixto JB, Souza CT, Pinho RA, Dutra RC. Physical Exercise Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting Peripheral Immune Response and Blood-Brain Barrier Disruption. *Mol Neurobiol*. 2017;54(6):4723-4737.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:683-747.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Semin Neurol*. 2016;36:115–27.



[Silveira](#) PC, Venâncio M, Souza PS, Victor EG, de Souza Notoya F, Paganini CS, Streck EL, da Silva L, Pinho RA, Paula MM. Iontophoresis with gold nanoparticles improves mitochondrial activity and oxidative stress markers of burn wounds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;44:380-5.

[Silveira](#) PC, Victor EG, Notoya F de S, Scheffer D da L, Silva Ld, Cantú RB, Martínez VH, de Pinho RA, Paula MM. Effects of phonophoresis with gold nanoparticles on oxidative stress parameters in a traumatic muscle injury model. *Drug Deliv*. 2016;23(3):926-32.

Sintov AC, Levy HV, Botner S. Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: In vitro and in vivo studies. *Journal of Controlled Release*. 2010;148(2),168-176.

Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006; 1(4):1810-9.

Sumbayev VV, Yasinska IM, Garcia CP, Gilliland D, LallGS, et al. Gold nanoparticles downregulate interleukin-1 $\beta$ -induced pro-inflammatory responses. *Smal*. 2013; 9(3):472-77.

Sung WS, Chen YY, Dubey A, Hunn A. Spontaneous regression of syringomyelia--review of the current aetiological theories and implications for surgery. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2008;15(10),1185-8.

Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:713-758.

Tang Y, Luo M, Pan K, Ahmad T, Zhou T, Miao Z, Zhou H, Sun H, Xu X, Namaka M, Wang Y. DNA hydroxymethylation changes in response to spinal cord damage in a multiple sclerosis mouse model. *Epigenomics*. 2019;11(3):323-335.

Tsai CY; Shiau AL; Chen SY; Chen YH; Cheng PC; Chang MY; Chen DH; Chou CH; Wang CR; Wu CL. et al. Amelioration of collagen-induced arthritis in rats by nanogold. *Arthritis & Rheumatism*. 2007;56(2):544-54.

Tsai CY, Shiou-Ling L, Chia-Wen H, Chen-Sheng Y, Gwo-Bin L, Huan-Yao L. Size-dependent attenuation of TLR9 signaling by gold nanoparticles in macrophages. *J Immunol*. 2012;188(1):68-76

Tanaka F, Vines D, Tsuchida T, Freedman M, Ichise M. Normal patterns on 99mTc-ECD brain SPECT scans in adults. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. 2000;41(9),1456-1464.

Tartuce LP. Caracterização química e biológica da associação entre nanopartícula de ouro e sestamibi na lesão de reperfusão cardíaca. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2017.

Tavares AJ, Poon W, Zhang YN, Dai Q, Besla R, Ding D, Ouyang B, Li A, Chen J, Zheng G, Robbins C, Chan WCW. Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(51):E10871-E10880.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, J. C.; Sasaki, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.

Ugwoke MI, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005;57(11),1640-1665.

Vallabhajosula S, Zimmerman RE, Picard M, Stritzke P, Mena I, Hellman RS, Goldsmith SJ. Technetium-99m ECD: a new brain imaging agent: in vivo kinetics and biodistribution studies in normal human subjects. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*. 1989;30(5), 599-604.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 693-733.

Van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):141-50.

Van Meeteren ME, Teunissen CE, Dijkstra CD, van Tol EA. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Eur J Clin Nutr*. 2005;59(12):1347-61.

Van Huizinga R, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, van Meurs M, Voerman JS, Biber KP, Boddeke HW, Höpken UE, Meisel C, Meisel A, Bechmann I, Hintzen RQ, 't Hart BA, Amor S, Laman JD, Boven LA. Brain antigens in functionally distinct antigen presenting cell populations in cervicallymphnodes in MS and EAE. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(3):273-86.

Velasco-Aguirre C, Morales F, Gallardo-Toledo E, Guerrero S, Giralt E, Araya E, Kogan MJ. Peptides and proteins used to enhance gold nanoparticle delivery to the brain: Preclinical approaches. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;10, 4919-4936.

Venkatesha SH, Dudics S, Acharya B, Moudgil KD. Cytokine modulating strategies and newer cytokine targets for arthritis therapy. *Int J Mol Sci*. 2014;16(1):887-906.

Venters HD, Dantzer R, Kelley KW. A new concept in neurodegeneration: TNFalpha is a silencer of survival signals. *Trends Neurosci*. 2000;23(4):175-180.

[Victor](#) EG, Silveira PC, Possato JC, da Rosa GL, Munari UB, de Souza CT, Pinho RA, da Silva L, Streck EL, Paula MM. Pulsed ultrasound associated with gold nanoparticle gel reduces oxidative stress parameters and expression of

pro-inflammatory molecules in an animal model of muscle injury. *J Nanobiotechnology*. 2012;12;10:11.

Vogelaar CF, Mandal S, Lerc S, Birkner K, Birkenstock J, Bühler U, Zipp F. Fast direct neuronal signaling via the IL-4 receptor as therapeutic target in neuroinflammation. *Science Translational Medicine*. 2018;10(430), eaao2304.

Xing Y, Liu B, Zhao Y, Zhang L, Thome R, Xue H, Zhang P, Ma C. Immunomodulatory and neuroprotective mechanisms of Huangqi glycoprotein treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Folia Neuropathol*. 2019;57(2):117-128.

Walsh JT, Hendrix S, Boato F, Smirnov I, Zheng J, Lukens JR, Gadani S, Hechler D, Götz G, Rosenberger K, Kammertöns T, Vogt J, Vogelaar C, Siffrin V, Radjavi A, Fernandez-Castaneda A, Gaultier A, Gold R, Kanneganti TD, Nitsch R, Zipp F, Kipnis J. MHCII-independent CD4<sup>+</sup> T cells protect injured CNS neurons via IL-4. *J Clin Invest*. 2015;125(6):2547.

Wang J, Chen F, Zheng P, Deng W, Yuan J, Peng B, Wang R, Liu W, Zhao H, Wang Y, Wu G. Huperzine A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via the suppression of T cell-mediated neuronal inflammation in mice. *Exp Neurol*. 2012; 236(1):79-87.

Wang C, Wang C, Dong H, Wu XM, Wang C, Xia F, Li G, Jia X, He S, Jiang X, Li H, Xu H. Immune-related GTPase Irgm1 exacerbates experimental auto-immune encephalomyelitis by promoting the disruption of blood-brainbarrier and blood-cerebro spinal fluid barrier. *Mol Immunol*. 2013; 53(1-2):43-51.

Wang W, Ding X, Xu Q, Wang J, Wang L, Lou X. Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016;148:541-48.

Waxman SG, Ritchie JM. Organization of ion channels in the myelinated nerve fiber. *Science*. 1985;228(4707):1502-7.

[Weiss](#) N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(4):842-57.

Wiley DT, Webster P, Gale A, Davis ME. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(21),8662-8667.

Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, Chan WCW. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater*. 2016, 1, 16014.

Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest*. 2001;81(3):263-81.

Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis.* 2011; 2011:164608.

Xiong Y, Gao W, Xia F, Sun Y, Sun L, Wang L, Ben S, Turvey SE, Yang H, Li Q. Peptide-Gold Nanoparticle Hybrids as Promising Anti-Inflammatory Nanotherapeutics for Acute Lung Injury: In Vivo Efficacy, Biodistribution, and Clearance. *ADv Healthc Mater.* 2018;7(19):e1800510.

Xu MX, Wang M, Yang WW. Gold-quercetin nanoparticles prevent metabolic endotoxemia induced kidney injury by regulating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling and Nrf2 pathway in high fat diet fed mice. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:327-345.

Yang J, Zhang R, Lu G, Shen Y, Peng L, Zhu C, Cui M, Wang W, Arnaboldi P, Tang M, Gupta M, Qi CF, Jayaraman P, Zhu H, Jiang B, Chen SH, He JC, Ting AT, Zhou MM, Kuchroo VK, Morse HC 3rd, Ozato K, Sikora AG, Xiong H. Tcell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *J Exp Med.* 2013; 210(7):1447-62.

Yin JX, Tu JL, Lin HJ, Shi FD, Liu RL, Zhao CB, Coons SW, Kuniyoshi S, Shi J. Centrally administered pertussis toxin inhibits microglia migration to the spinal cord and prevents dissemination of disease in an EAE mouse model. *Plos One.* 2010; 5(8):e12400

Zhang Q, Hitchins VM, Schrand AM, Hussain SM, Goering PL. Uptake of Gold Nanoparticles in Murine Macrophage Cells without Cytotoxicity or Production of pro-Inflammatory Mediators. *Nanotoxicology.* 2011;5(3):284-95.

Zhang W, Yaob Z-J, Deng W. Palladium Nanoparticles Supported on  $\beta$ -cyclodextrin Functionalised Poly(amido amine)s and their Application in Suzuki-Miyaura. *J Braz Chem Soc.* 2019; 30:1667-1677.

Zhu S, Jiang X, Boudreau MD, Feng G, Miao Y, Dong S, Yin JJ. Orally administered gold nanoparticles protect against colitis by attenuating Toll-like receptor 4- and reactive oxygen/nitrogen species-mediated inflammatory responses but could induce gut dysbiosis in mice. *Journal of Nanobiotechnology.* 2018;16(1).

Ziemssen T, Ziemssen F. The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmun. Rev.* 2005; 4:460-467.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron.* 2008; 57(2):178-201.

Zortéa D, Silveira PC, Souza PS, Fidelis GS, Paganini CS, Pozzi BG, Tuon T, De Souza CT, Paula MM, Pinho RA. Effects of phonophoresis and gold nanoparticles in experimental model of muscle overuse: role of oxidative stress. *Ultrasound Med Biol.* 2015;41(1):151-62.

Zou X, Ying E, Dong S. Seed-mediated synthesis of branched gold nanoparticles with the assistance of citrate and their surface-enhanced Raman scattering properties. *Nanotechnology*. 2006; 17:4758–4764.

**ANEXO(S)**

**ANEXO 1 – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais**



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Uso terapêutico de nanopartículas de ouro ligadas ao etilenodicisteinadietil éster e ao sestamibi sobre parâmetros inflamatórios e de estresse oxidativo no sistema nervoso central de animais expostos a um modelo experimental de esclerose múltipla."**, registrada com o protocolo nº **037/2016-2**, sob a responsabilidade de **Ricardo Aurino de Pinho**, junto à equipe: Priscila Soares de Souza, Giulia dos Santos Pedroso Fidelis, Stella Maria Spessatto Brescianini, Fernanda Tavares Pereira - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **04/10/2016**.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/10/2016 a 01/09/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico C57BL/6
Nº de animais	180
Idade/Peso	30 dias / 20-25g
Sexo	Feminino
Origem	Biotério da Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: **"Therapeutic use of gold nanoparticles linked to etilenodicisteinadiethyl ester and sestamibi on inflammatory parameters and oxidative stress in central nervous system of animals exposed in an experimental model of multiple sclerosis (ME)."**


Protocol number: **037/2016-2**

Principal Investigator: **Ricardo Aurino de Pinho**

Researchers: **Priscila Soares de Souza, Giulia dos Santos Pedroso Fidelis, Stella Maria Spessatto Brescianini, Fernanda Tavares Pereira.**

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua) or by e-mail: [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma, 04 de outubro de 2016.

  
Jairo José Zocche  
Coordenador da CEUA